



**Maria João
Esteves Caldeira**

**Avaliação dos níveis de ADN recuperado de
amostras ósseas forenses através da otimização do
método de extração semi-automatizado**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.



**Maria João
Esteves Caldeira**

**Avaliação dos níveis de ADN recuperado de
amostras ósseas forenses através da otimização do
método de extração semi-automatizado**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e coorientação da Mestre Ana Margarida Ventura Teixeira Bento, Especialista Superior de Medicina Legal no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

Dedico aos meus avós, António, Ester e José.

o júri

presidente

Prof. Doutor Mário Guilherme Garcês Pacheco
Professor Associado C/Agregação, Universidade de Aveiro

arguente principal

Prof. Doutora Maria De Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada C/Agregação, Universidade de Aveiro

orientador

Mestre Ana Margarida Ventura Teixeira Bento
Especialista Superior de Medicina Legal no Serviço de Genética e Biologia Forenses da
Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

agradecimentos

O sucesso de um projeto depende do empenho de cada membro da equipa, por isso tenho que agradecer a todos que participaram comigo na construção desta tese.

O meu muito obrigado à Mestre Ana Margarida Bento, que sempre disponível e dedicada, me apoiou incansavelmente, tendo sido uma excelente professora e uma boa amiga.

Agradeço ao Professor Doutor Luís Souto por ter aceite ser meu orientador e me ter ajudado a alcançar o objetivo de desenvolver a minha tese na área apaixonante da biologia e genética forense.

Obrigado a todos os que me acompanharam no Serviço de Genética e Biologia Forense do INMLCF de Coimbra, em especial à Doutora Maria João Porto pela oportunidade de trabalhar nesta entidade, e às minhas companhias diárias, Dona Celeste e Dona Glória, por todo o carinho, amizade e motivação.

Agradeço a todos os meus amigos de todas as diferentes casas que ganhei ao longo deste percurso académico, Covilhã, Coimbra e Aveiro, por me terem apoiado e motivado nos momentos mais difíceis, sem esquecer os amigos de sempre da minha cidade jardim.

Obrigado Guilherme por tornares sempre o impossível em possível.

Por fim, agradeço aos meus pilares, pai, mãe e mano, por me darem “pernas” para continuar a subir “escadas”, por todo o vosso amor e compreensão. Obrigado

palavras-chave

Amostras ósseas, DVI, extração sólida, genética forense, *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction*, volume de eluição

resumo

Num ambiente perfeito o ADN pode ser extraído de qualquer material biológico, como cabelo, saliva, sangue e até osso. Um desastre em massa, quer seja natural, quer artificial, apresenta condições adversas que podem levar a uma extensa carbonização, fragmentação e putrefação tornando difícil a obtenção de um bom perfil de ADN, sendo muitas vezes os tecidos duros, ossos e dentes, os únicos viáveis para a extração. Os ossos e dentes possuem biologicamente quantidades de ADN menores, e logo, os métodos de extração têm que ser escolhidos de modo a recuperar o máximo de material genético possível.

Foram analisadas 11 amostras vestígio ósseas provenientes do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses em Coimbra, através da extração do seu material genético com o kit *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction no robot AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System*, que utiliza partículas magnéticas. Após a extração, procedeu-se à quantificação, amplificação e separação eletroforética, para obtenção de resultados da análise genética. O kit *PowerPlex® Fusion 6C System* devido à combinação de marcadores muito informativos, tal como o kit *GlobalFiler™ PCR Amplification*, é recomendado para amostras degradadas, com pouco material ou até misturas, sendo utilizados neste estudo para análise dos produtos de extração. O objetivo centrou-se na comparação dos métodos com diferentes volumes de eluição, 20µl e 50µl, avaliando os níveis de recuperação de ADN e a qualidade dos perfis obtidos.

Este método mostrou-se muito útil para amostras difíceis com baixos níveis de ADN e elevada degradação, conseguindo aumentar a concentração de ADN recuperado e obter perfis com maior qualidade comparativamente ao protocolo em uso, aumentando a eficiência de análise que é importante em casos de identificação de vítimas de desastre (DVI).

keywords

Bone samples, DVI, solid extraction, forensic genetics, PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction, elution volume

abstract

In a perfect environment DNA can be extracted from any biological material, as hair, saliva, blood and even bone. A mass disaster, natural or artificial, presents adverse conditions that can lead to extensive carbonization, fragmentation, and putrefaction making it difficult to obtain a good DNA profile, and often the hard tissues, bones and teeth are the only feasible for extraction. Bones and teeth have biologically smaller amounts of DNA, so the extraction methods have to be chosen in order to recover as much genetic material as possible.

Eleven bone traces samples from the National Institute of Forensic Medicine and Forensic Sciences in Coimbra were analyzed by extracting their genetic material with the PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction kit in the AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System, which uses magnetic particles. After extraction, electrophoretic quantification, amplification and separation were performed to obtain genetic analysis results. The PowerPlex® Fusion 6C System kit due to the combination of very informative markers, such as the GlobalFiler™ PCR Amplification kit, is recommended for degraded samples, with little material or even mixtures, and is used in this study to analyze the extraction products. The objective was to compare the methods with different volumes of elution, 20µl and 50µl, evaluating the levels of DNA recovery and the quality of the profiles obtained.

This method proved to be very useful for difficult samples with low levels of DNA and high degradation, being able to increase the concentration of recovered DNA and obtain profiles with higher quality compared to the protocol in use, increasing the efficiency of analysis that is important in cases of disaster victim identification (DVI).

Índice

agradecimentos	vi
resumo	vii
abstract	viii
Índice	ix
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
Índice de Abreviaturas e Símbolos	xii
Introdução	1
1. O ácido desoxirribonucleico (ADN) em contexto forense	1
2. Genética Forense e Identificação Civil	4
3. Amostras biológicas difíceis: ossos e dentes	6
4. A extração de ADN: a sua importância e os seus fundamentos	8
5. Amplificação e deteção de fragmentos	12
Objetivo	19
Procedimento experimental	21
1. Amostragem	21
2. Preparação das amostras	21
3. Extração	22
4. Quantificação	24
5. Amplificação	26
6. Separação eletroforética	27
Resultados e Discussão	29
Conclusão	43
Referências Bibliográficas	45

Índice de Figuras

Figura 1 Mini-STRs. Adaptado de (Butler, 2009)	2
Figura 2 Composição do osso: trabecular versus cortical. Adaptado de Nalla et al., 2006	7
Figura 3 Estrutura do dente (molar). Adaptado de Higgins & Austin, 2013	8
Figura 4 Captura de ADN por partículas magnéticas. Adaptado de Topçu, Aşır, & Türkmen, 2016	10
Figura 5 AutoMate Express™ com os kits PrepFiler Express™ e PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction. (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/product-images/4441763_650x600.jpg)	12
Figura 6 Eletroforese Capilar. Adaptado Butler, 2012.	18
Figura 7 Viais montados utilizados na moagem do material biológico em azoto líquido. Adaptado de (Corte-Real & Porto, 2015)	21
Figura 8 Perfis obtidos para a amostra A com os protocolos modificados M50 E M20	34
Figura 9 Perfis obtidos para a amostra B com os protocolos normais N50 e N20	35
Figura 10 Perfis obtidos para a amostra C com os protocolos normais N50 e N20	36
Figura 11 Perfis obtidos para a amostra D com os protocolos normais N50 e N20	37
Figura 12 Perfis obtidos para a amostra J com os protocolos normais N50 e N20	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 Tipo de amostras ósseas	21
Tabela 2 Peso de amostra conforme o tipo de extração	22
Tabela 3 Preparação da solução de lise para a extração por PrepFiler™ BTA Express conforme o protocolo	23
Tabela 4 Volume de sobrenadante necessário conforme o protocolo	23
Tabela 5 Volume de eluição conforme o Protocol Card	24
Tabela 6 Preparação das diluições em série a partir da solução de 100 ng/ µl	25
Tabela 7 Quantidades de componentes do Quantifiler™ Trio para o Real Time PCR	25
Tabela 8 Quantidades de componentes de PCR por amostra com kit GlobalFiler e PowerPlex Fusion 6C	26
Tabela 9 Ciclos Térmicos kit GlobalFiler™ PCR Amplification	27
Tabela 10 Ciclos Térmicos kit PowerPlex® Fusion 6C System	27
Tabela 11 Preparação da separação dos produtos amplificados. Valores em µl por amostra.	28
Tabela 12 Quantificações de ADN das amostras conforme o tipo de extração Normal ou Modificada (*) com 50 µl ou 20 µl de volume de eluição. ID (índice de degradação, calculado por $\frac{[SA]}{[LA]}$), IPC (internal PCR control), Vm (Valor médio) e % (variação percentual entre os protocolos 50 e 20 µl, calculada por $\frac{V_{mf} - V_{mi}}{V_{mi}} \times 100$).	31
Tabela 13 Perfis consenso obtidos para cada amostra conforme o protocolo realizado. Com verde para o locus completo, amarelo para allele drop-out e vermelho para locus drop-out. N50 (protocolo normal com 50 µl de volume de eluição); N20 (protocolo normal com 20 µl de volume de eluição); M50 (protocolo modificado com 50 µl de volume de eluição); M20 (protocolo modificado com 20 µl de volume de eluição).	32

Índice de Abreviaturas e Símbolos

ABI - *Applied Biosystems*

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

BSA – *Bovine Serum Albumin*

BTA – *Bone Teeth Adhesive*

CE – *Capillary Electrophoresis*

CODIS – *Combined Index System*

DVI – *Disaster Victim Identification*

DTT- *Dithiothreitol*

dNTPs - desoxirribonucleótidos trifosfato

ID - índice de degradação

IPC - *Internal PCR Control*

INMLCF - Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

LA – *large autossomal*

M - Molar

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

mg – miligrama

min. – minutos

NaClO - hipoclorito de sódio

ng - nanograma

PCR - *polymerase chain reaction*

PC - *Promega Corporation*

pH – potencial de hidrogénio

Q - *Quencher*

R - *Reporter*

RFU – *Relative Fluorescence Units*

Rpm – rotações por minuto

SA – *small autossomal*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

STD – *Standard*

STR - *Short Tandem Repeats*

Taq - *Thermus aquaticus*

TE - Tris EDTA

UV - Ultravioleta

xg - força centrífuga

°C - graus *Celsius*

µl - picolitros

" - segundos

% - percentagem

Introdução

1. O ácido desoxirribonucleico (ADN) em contexto forense

A nucleína, ou ácido desoxirribonucleico (ADN), foi isolada pela primeira vez em 1989 por Friedrich Miescher e, passadas várias décadas e vários estudos, esta molécula é hoje representada como o livro da vida, onde toda a informação celular está escrita. A sua unidade básica, o nucleótido, apresenta-se em quatro formas diferentes, a adenina, a timina, a citosina e a guanina. Estes nucleótidos repetem-se múltiplas vezes ao longo da molécula de ADN construindo, no seu conjunto, o código genético que é único para cada pessoa. O ADN é a chave da hereditariedade, sendo o alelo definido como unidade de hereditariedade por Mendel, a variante de um gene ou *locus* (Dahm, 2005; Paes & Ribeiro, 2016).

O poder informativo do ADN, conhecido com o método de sequenciação de Fredrick Sanger (1960), impulsionou o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular e celular. Por volta dos anos 80, técnicas de análise de ADN, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) de Kary Mullis, tornaram-se uma ferramenta essencial para a identificação humana e para a investigação criminal, tendo assim um impacto na lei e ciências forenses (Butler, 2009; Paes & Ribeiro, 2016).

Em contexto forense, há recurso à análise de ADN em diversos tipos de questões judiciais. Em caso de crime, por exemplo, usa-se o perfil genético quando é necessário identificar o perpetrador ou então relacioná-lo com a cena de crime, podendo servir também para ilibação. Em casos civis, como em casos de paternidade e identificação de vítimas de desastres (DVI, do inglês *desaster victim identification*), o ADN é também a ferramenta usada, podendo em muitos casos ser a única forma de identificação (Terra Pinheiro, 2010).

O ADN é uma molécula estável, mas quando sujeita a mudanças ambientais extremas, que se podem verificar em diferentes casos forenses, como DVI, pode degradar e muitas vezes ser comprometida a sua análise. Fatores como a temperatura, humidade, potencial de Hidrogénio (pH), as propriedades geoquímicas do meio da amostra e a presença de microrganismos afetam a estrutura do ADN. As principais reações que degradam a estrutura do ADN são de oxidação e de hidrólise. O dano oxidativo resulta na modificação das bases azotadas, enquanto que o dano hidrolítico resulta na desaminação das bases e na depurinação e depirimidinação. Ambos resultam em modificação das bases do ADN, causando a fragmentação da molécula. Radiações ionizantes, radiações Ultravioleta (UV) e a ação de ácidos e do calor também afetam a estrutura do ADN (Terra Pinheiro, 2010; Zupanič Pajnič *et al.*, 2016).

Esta degradação pode afetar a análise genética, uma vez que a degradação da cadeia de ADN pode alterar o sucesso de amplificação das zonas de interesse forense, existindo perda de informação genética e falha na deteção das repetições em tandem (STRs, do inglês *Short tandem repeats*) (Terra Pinheiro, 2010).

1.1. Short tandem repeats (STR)

Nas regiões não codificantes de genoma humano, há conjuntos de unidades de repetição de nucleótidos que podem variar em comprimento e em composição da unidade de repetição, os STRs. Estes polimorfismos de ADN, entre os marcadores genéticos existentes, são os mais usados em genética forense para a identificação genética das amostras (Terra Pinheiro, 2010).

Para a genética forense, um marcador genético deve possuir elevado poder de discriminação, ser pouco mutável, deve possibilitar a obtenção de resultados de forma fácil e reprodutível e produzir produtos de amplificação pequenos com poucos artefactos (Terra Pinheiro, 2010). Os microssatélites, STRs, têm entre 2 a 7 pares de bases e são facilmente amplificáveis por PCR e separados eletroforeticamente. Podem ser mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídicos, sendo os mais utilizados na análise forense os tetranucleotídicos, visto terem a capacidade de produzir produtos de PCR de pequeno tamanho, o que em casos de amostras degradadas é benéfico, e ainda apresentam menor percentagem de bandas *stutter* (Butler, 2009; Laureu, 2013; Terra Pinheiro, 2010).

A degradação das amostras, como foi anteriormente referido, altera o sucesso de amplificação. Para aumentar a eficiência da obtenção do perfil de STRs pode-se diminuir o tamanho do produto de amplificação, redesenhando os *primers* de modo a ligarem-se mais perto da região do STR, retendo a mesma informação. Denominados mini-STRs, estes marcadores são úteis para casos que envolvam amostras difíceis como ossos (Figura 1) (Butler, Coble, & Vallone, 2007; Laureu, 2013; Terra Pinheiro, 2010).



Figura 1 Mini-STRs. Adaptado de (Butler, 2009)

Os STRs podem ser autossômicos (estão presentes nos autossomas) ou sexuais (do cromossoma X e do cromossoma Y). Os STRs autossômicos são utilizados sempre que seja requerida uma identificação individual. Se é necessária informação adicional, os cromossomas sexuais também são utilizados. Nos casos de paternidade, os STRs do cromossoma Y são úteis para definir uma linhagem paterna e identificar o sexo masculino, que em casos criminais, são úteis em amostras de mistura. Os STRs do cromossoma X são mais utilizados em casos de paternidade na ausência do pretenso pai (Terra Pinheiro, 2010).

De todos os STRs existentes, apenas um número pequeno de *loci* de STRs foram selecionados para a identificação humana. Em 1997, 13 *core loci* STR foram escolhidos para a base de dados CODIS (*Combined DNA Index System*), nomeadamente VWA, TH01, D21S11, FGA, D8S1179, D3S1358, D18S51, D16S539, D5S818, D7S820, D13S317, CSF1PO e TPOX (Butler, 2006, 2007). Em janeiro de 2017, nos Estados Unidos, novos STRs foram introduzidos passando de 13 *core loci* a 20 *core loci*, com a adição dos STRs D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391, D22S1045, D2S1338 e D19S443 (Ludeman *et al.*, 2018).

Com o aumento dos casos de identificação genética, empresas de biotecnologia como a *Applied Biosystems (ABI)* e a *Promega Corporation (PC)* desenvolveram *kits* para a utilização na genética forense tendo em conta os *loci* STR conhecidos e utilizados pelo CODIS (Butler, 2012). Estes *kits* comerciais possibilitam a análise simultânea de vários STR *loci*, fornecendo uma mistura dos vários *primers* marcados com diferentes fluorocromos e outra mistura com os restantes componentes da PCR, como a polimerase, o cloreto de magnésio (MgCl₂) e os desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Os *kits* fornecem ainda os *ladders* alélicos, que são misturas artificiais de alelos comuns da população para o STR em questão (Butler, 2007, 2012).

Os *kits* comerciais, mesmo sendo mais caros em relação à produção da mistura de reagentes pelos laboratórios, tornaram-se a escolha mais comum nos laboratórios forenses devido a permitirem uma simplificação e padronização dos procedimentos o que facilita a comparação de perfis de ADN. O *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (ABI)* e o *PowerPlex® Fusion 6C System (PC)* são exemplos de *kits* comerciais usados atualmente nos laboratórios forenses (Butler, 2007; Decorte, 2010).

O *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* apresenta os 20 *core loci* de STRs autossômicos, o STR altamente polimórfico SE33, dois marcadores específicos de Y dos quais um STR e um indel (*locus* de inserção/deleção) e o marcador determinante do sexo, a ameloglobina (AMEL). Sendo um *kit* com sistema de 6 fluorocromos, os *primers* encontram-se marcados com 6-FAM™, VIC®, NED™, TAZ™ e SID™, sendo o LIZ 600 o *size standard* (Ludeman *et al.*, 2018; ThermoFisher Scientific, 2016).

O *PowerPlex® Fusion 6C (PC)* tem 27 loci de STRs que permite a amplificar os 20 core loci, o SE33, o Penta D e o Penta E, a AMEL e os três marcadores do Y (DYS391, DYS570 e DYS576). Este kit tem um sistema de 6 fluorocromos, o FL, o JOE, o TOM, o TMR, o CXR e como size standard, o WEN ILS 500. Os primers são especificamente desenhados para ADN humano e a reação usa uma polimerase de ADN termoestável de *hot-start*. O kit *PowerPlex® Fusion 6C System* devido à combinação de marcadores muito informativos, tal como o kit *GlobalFiler™ PCR Amplification*, é recomendado para amostras degradadas, com pouco material ou até misturas (Cisana, Cerri, Bosetti, Verzeletti, & Cortellini, 2017; Holmes, Houston, Elwick, Gangitano, & Hughes-Stamm, 2018; Promega Corporation, 2017).

Após a obtenção dos perfis de STRs de cada amostra problema, a sua análise e comparação com amostras de referência, permitirá concluir a identidade do perpetrador em caso de crime, e do desconhecido, em casos de corpos desconhecidos e de vítimas de desastres.

2. Genética Forense e Identificação Civil

As investigações de paternidade são dos casos civis mais comuns num laboratório forense. O objetivo desta perícia é determinar, a partir de um trio (filho, mãe e pretenso pai) se este último é o pai biológico. Em alguns casos o pretenso pai está ausente ou falecido, sendo que, nestas situações, ou se recorre a familiares do mesmo, o que torna a perícia mais complexa, ou se recorre à exumação do cadáver no caso do pretenso pai estar falecido (Iwamura, Soares-Vieira, & Muñoz, 2004; Terra Pinheiro, 2010)

Em exumações, as amostras biológicas presentes, dependendo do tempo *post-mortem*, são sobretudo ossadas. O osso/dente, uma amostra difícil, torna-se assim a única fonte de ADN para a obtenção do perfil genético (Terra Pinheiro, 2010). Embora em casos de exumações o ADN possa já estar muito degradado, sendo difícil a sua análise, os desastres em massa são os que apresentam maiores dificuldades para a perícia devido a todas as variáveis relacionadas com estes, tornando-os num tema muito discutido pela comunidade forense.

Um desastre pode ser classificado em desastre de causa humana, como o terrorismo, e em desastre natural, como os tsunamis, podendo também ser classificado em desastre aberto, sem informação exata do número de vítimas como é também o caso dos tsunamis, e em desastre fechado, onde há dados prévios ao acontecimento para a identificação das vítimas, por exemplo a lista de passageiros aquando a queda de um avião. Qualquer um destes tipos de desastres pode provocar vítimas mortais, e como tal, estas precisam de ser identificadas e todos os procedimentos para a DVI necessitam de ser conhecidos e estudados previamente, por exemplo, através de documentos informativos como o *Interpol Guide to Disaster Victim Identification*, para melhorar a resposta a este tipo de acontecimentos (Butler, 2012; Prinz *et al.*, 2007; Siriboonpiputtana,

Rinthachai, Shotivaranon, Peonim, & Rerkamnuaychoke, 2018; Terra Pinheiro, 2009; Ziętkiewicz *et al.*, 2012).

Desde que há civilização, muitos desastres de vários tipos provocaram milhares de vítimas, como por exemplo, a explosão nuclear de Chernobyl que fez mais de 31,000 vítimas mortais em 1986, o ataque terrorista às *Twin Towers* no *World Trade Center* com mais de 2,700 vítimas no 11 de setembro de 2001 e, mais recentemente, em janeiro de 2010, o terremoto no Haiti com 230,000 vítimas (Holland, Cave, Holland, & Bille, 2003; Ziętkiewicz *et al.*, 2012). O 11 de setembro foi das tragédias com mais impacto na genética forense, em que devido à natureza do desastre, os corpos estavam muito fragmentados e expostos a vários fogos devido ao colapso dos edifícios, sendo que grande parte das amostras problema eram ossadas carbonizadas e necessitavam de análise do ADN para a sua identificação. O grande número de amostras problema fragmentadas dificultou a análise de ADN e a finalização da perícia o que impulsionou o desenvolvimento de novas metodologias e equipamentos para a análise forense de ADN, como por exemplo novos métodos de extração de ADN de ossos (Butler, 2012; Holland *et al.*, 2003).

Assim, dependendo das circunstâncias da tragédia, existem muitos fatores que influenciam o sucesso da DVI o que torna muito difícil a identificação das vítimas por meio tradicional, onde a identificação através da antropologia é inconclusiva e até impossível, sendo necessário recorrer ao ADN para uma identificação correta (Alonso *et al.*, 2005; Graham, 2006; Hartman, Drummer, Eckhoff, Scheffer, & Stringer, 2011; Ziętkiewicz *et al.*, 2012).

Outro ponto importante para a DVI através de análise de ADN, são as amostras de referência/conhecidas, que são tão importantes como as amostras não identificadas. Em genética forense, um perfil genético por si só não oferece nenhuma resposta, a análise de ADN é baseada em comparações, e em casos de DVI, não se tem uma identificação se não se conseguir comparar com outros perfis genéticos conhecidos que são, se possível, conseguidos através de objetos pessoais ou de familiares. Nestes casos, o perfil genético obtido da amostra problema é comparado com recurso a programas informáticos, com os vários perfis conhecidos para facilitar a análise, pois, normalmente estes incidentes envolvem um número elevado de vítimas o que pressupõe também um número elevado de amostras de referência (Alonso *et al.*, 2005; Butler, 2009, 2012; Montelius & Lindblom, 2012).

3. Amostras biológicas difíceis: ossos e dentes

Como referido anteriormente, os casos que envolvem restos cadavéricos são mais difíceis de concluir, como os casos de desastres em massa, uma vez que as condições adversas a que os restos das vítimas estão sujeitos prejudicam o sucesso da identificação. A escolha do tipo de material a analisar é um fator importante visto que há diferentes graus de degradação dependendo do tipo de material biológico, sendo que, usualmente o ADN nos ossos está menos degradado que o ADN do tecido muscular e sangue (Ziętkiewicz *et al.*, 2012). Os tecidos duros em condições adversas, como as altas temperaturas, são mais resistentes à autólise o que torna os dentes, ossos e unhas muitas das vezes a única fonte de ADN neste tipo de caso forense (Corte-Real & Porto, 2015; Davoren *et al.*, 2007).

Conhecer a morfologia das amostras problema difíceis, como ossos e dentes, é importante para saber que tipo escolher e como processá-las de modo a obter os melhores resultados possíveis.

3.1. Ossos

Os ossos são classificados em corticais, os mais densos, e em trabeculares, os menos densos. Este tecido duro apresenta uma componente inorgânica, constituída por hidroxiapatite carbonatada criptocristalina, e uma componente orgânica que é maioritariamente composta por colagénio tipo I, (Figura 2). São constituídos por osteoblastos, que são responsáveis pela formação do osso, produzindo grandes quantidades de tecido pré-ósseo, uma matriz rica em colagénio. Na mineralização óssea, a hidroxiapatite e a matriz rica em colagénio formam a massa óssea que engloba os osteoblastos tornando-os em osteócitos, células em estrela que ocupam as lacunas e responsáveis pela manutenção do osso. Os ossos são também constituídos por osteoclastos que realizam a reabsorção do osso removendo a massa óssea (Campos *et al.*, 2012; Mclamb, 2017; White, Black, & Folkens, 2012).

A localização do ADN no osso é discutida por vários autores, existindo várias hipóteses para justificar a preservação do ADN nos ossos durante muito tempo. Uma hipótese baseia-se na mineralização na formação do osso, onde há formação de lacunas entre a hidroxiapatite e o colagénio, podendo aí o ADN ficar retido, ligando-se aos minerais existentes, sendo que o colagénio forma pontes de hidrogénio com o ADN estabilizando-o (Campos *et al.*, 2012).

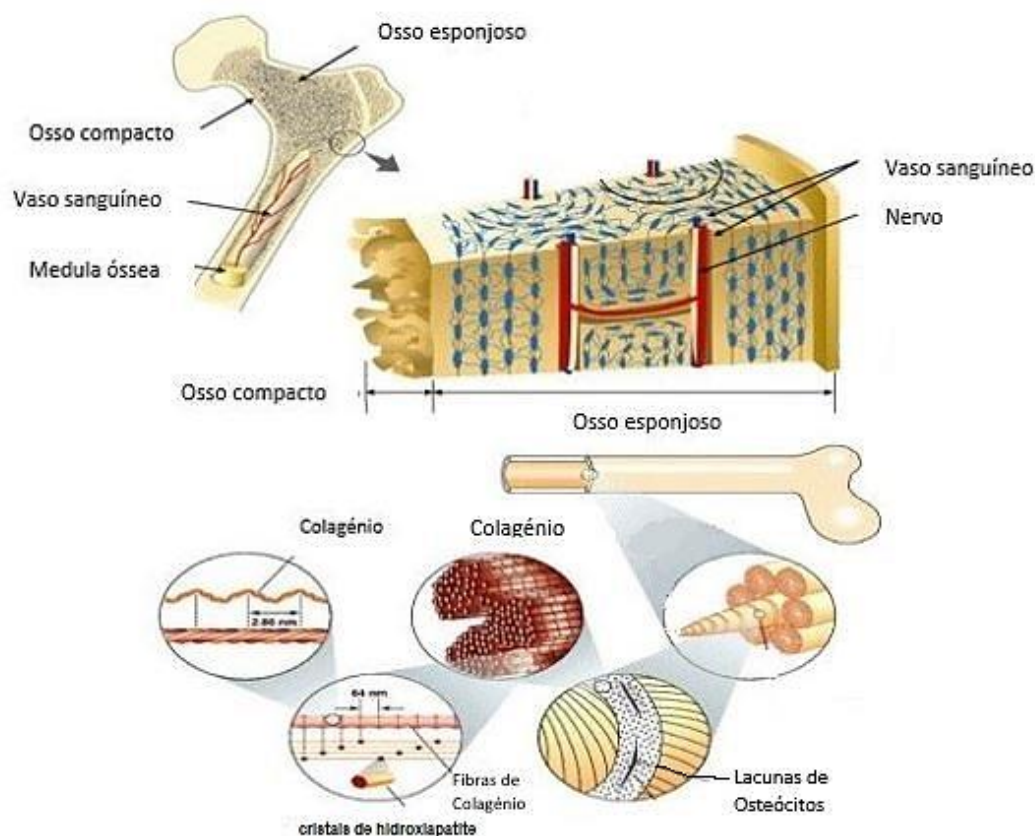


Figura 2 Composição do osso: trabecular versus cortical. Adaptado de Nalla et al., 2006

Vários artigos recomendam o uso do fêmur, um osso longo cortical mais denso, como primeira escolha para análise de ADN. Como o fêmur é denso e cortical, tem uma maior porção do osso mineralizada, o que forma uma barreira física que impede que enzimas ou agentes exógenos alterem o ADN, podendo-se obter melhores resultados (Milos *et al.*, 2007; Montelius & Lindblom, 2012; Prinz *et al.*, 2007; Siriboonpiputtana *et al.*, 2018; Walker, 2016; Westen, Gerretsen, & Maat, 2008).

3.2. Dentes

O dente é o tecido mais duro do corpo humano, que está dividido em coroa e em raiz, tendo como constituintes principais a dentina, o esmalte e a polpa. O esmalte cobre a superfície da coroa o que fornece uma boa barreira física para a dentina e polpa, uma vez que o esmalte é muito mineralizado. O cemento cobre a raiz, sendo este semelhante ao osso em composição química e física, com cementócitos na matriz como os osteócitos nas lacunas nos ossos, e, como tal, é uma boa fonte de ADN, (Figura 3), (Higgins & Austin, 2013; Mclamb, 2017; Milos *et al.*, 2007).

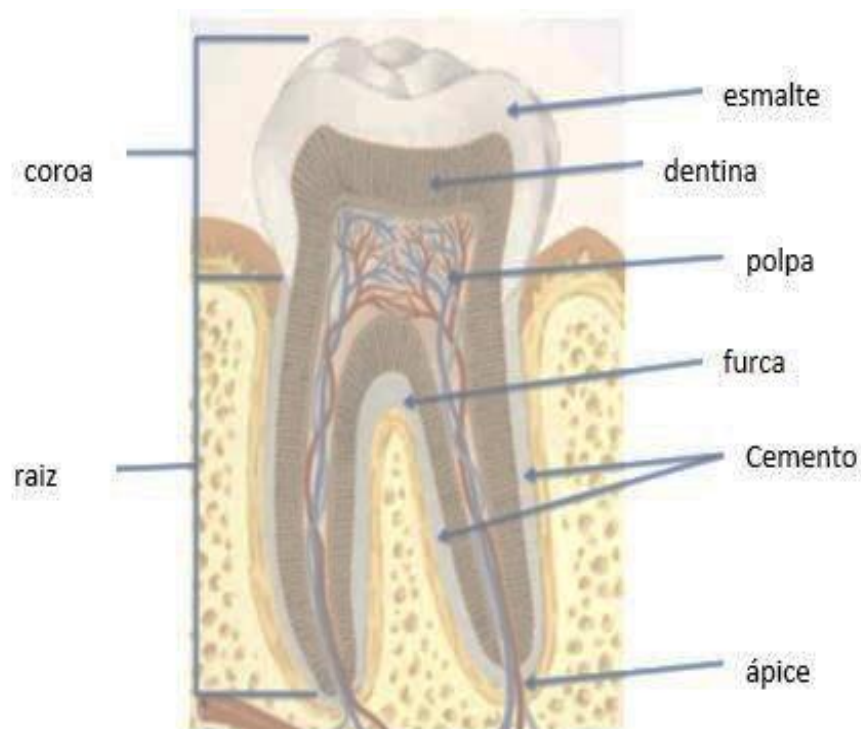


Figura 3 Estrutura do dente (molar). Adaptado de Higgins & Austin, 2013

Diversos estudos já demonstraram níveis elevados de sucesso na obtenção de perfis de ADN a partir de dentes (Higgins & Austin, 2013). A parte interna do dente é a considerada a mais celular, sendo constituída pela dentina e pela polpa. A dentina não contém corpos celulares nucleados e, sendo a polpa considerada a mais rica em ADN no dente, os dentes com maior quantidade de polpa serão também os mais ricos em ADN, como é o caso dos molares, que são os preferíveis em casos de DVI (Milos *et al.*, 2007; Stagg, 2010; Walker, 2016).

Em DVI, os ossos e dentes, são diversas vezes descritos como a melhor escolha neste tipo de caso forense, contudo outros tipos de amostra não devem ser ignorados. A escolha da melhor amostra problema depende sempre do que se encontrará no terreno, não existindo um tipo específico de amostra para todos os casos, pelo que é necessário verificar todas as variáveis que dependem das condições ambientais (Milos *et al.*, 2007; Walker, 2016).

4. A extração de ADN: a sua importância e os seus fundamentos

A escolha do método de extração depende da quantidade de ADN que se espera recolher da amostra, do tipo de amostra biológica e da presença de inibidores de PCR. Considerando estas variáveis, existem vários tipos de extração de ácidos nucleicos utilizados na análise forense, categorizando-se geralmente em extração orgânica e extração de fase sólida (Walker, 2016; Ziętkiewicz *et al.*, 2012).

Na extração orgânica, a mais conhecida é a extração por fenol-clorofórmio, uma extração líquido-líquido, onde a amostra é misturada com um volume de fenol-clorofórmio, após sofrer lise celular com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) um detergente que ajuda na desnaturação de proteínas, e com proteinase K, uma protease endolítica que digere as proteínas. Após centrifugação, o fenol-clorofórmio, sendo imiscível em água, vai produzir duas fases líquidas distintas. Visto que o ADN é mais solúvel em água, a fase orgânica contém os contaminantes celulares do ADN, incluindo enzimas, e a fase aquosa contém o ADN. Na fase aquosa, o ADN é precipitado do sobrenadante adicionando etanol que forma um *pellet* após a centrifugação. Considerada a mais eficiente na purificação e a que obtém maiores quantidades de ADN, a extração por fenol-clorofórmio perdeu prestígio nos laboratórios de análises forenses devido a envolver químicos perigosos e tóxicos para a saúde, sendo contudo ainda utilizado em muitos laboratórios (Butler, 2009; Tan & Yiap, 2009; Ziętkiewicz *et al.*, 2012).

Para além da natureza perigosa dos químicos requeridos na extração orgânica, existem outras razões para esta técnica ter perdido popularidade. Com a evolução da biotecnologia, a automatização das técnicas laboratoriais tornou-se uma realidade e a possibilidade da sua implementação na extração de ADN fez crescer a utilização da extração de fase sólida, diminuindo o tempo de processamento (Budowle & van Daal, 2009; Płotka-Wasyłka, Szczepańska, de la Guardia, & Namieśnik, 2016). Assim, sem necessitar de químicos tóxicos, com eficácia na remoção de inibidores, com automatização e menor tempo de processamento, a extração de fase sólida ganha cada vez mais terreno nas áreas da biologia molecular e celular, como a genética forense (Płotka-Wasyłka *et al.*, 2016; Tan & Yiap, 2009).

Na extração de fase sólida utiliza-se, como fase estacionária, um substrato sólido com afinidade ao analito para poder separá-lo dos restantes componentes celulares e recuperá-lo através de um tampão de eluição, que modifica a atração química do analito ao substrato sólido. Na área forense, como fase sólida com afinidade ao ADN, utiliza-se maioritariamente a sílica ou partículas magnéticas, onde, através de altas concentrações de sais caotrópicos, o ADN se liga seletivamente à fase sólida e, após várias lavagens, é purificado e eluído através de um tampão de eluição com baixa concentração salina (Butler, 2009; Reedy *et al.*, 2010). A extração sólida é, assim, uma técnica eficiente por ser seletiva e poder ser explorada através do pH e das características de solventes baseando-se na interação química do analito com o substrato sólido (D.A.Wells, 2000).

Comercialmente existem vários *kits* de extração sólida que podem ter diferentes substratos sólidos, como a *QIAamp® DNA Mini Extraction kit* (Quiagen), que utiliza a sílica, e o *DNA IQ™ System (PC)* e *PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (ABI)*, que têm como substrato sólido partículas magnéticas com polímeros incorporados. Os sistemas de extração por partículas magnéticas e por sílica podem ser automatizados, sendo que a extração por partículas magnéticas consiste na ligação do ADN às partículas magnéticas quando as condições vizinhas têm uma carga iónica apropriada, seguida da lavagem para eliminação de todos os componentes não ligados. Anteriormente à

lavagem, através de magnetismo, um íman atrai as partículas magnéticas com o ADN ligado, deixando apenas os contaminantes em solução, que são removidos posteriormente, não sendo necessária centrifugação ou filtração da amostra durante os vários passos da extração; Figura 4, (Butler, 2009; Płotka-Wasyłka *et al.*, 2016; Ziętkiewicz *et al.*, 2012).

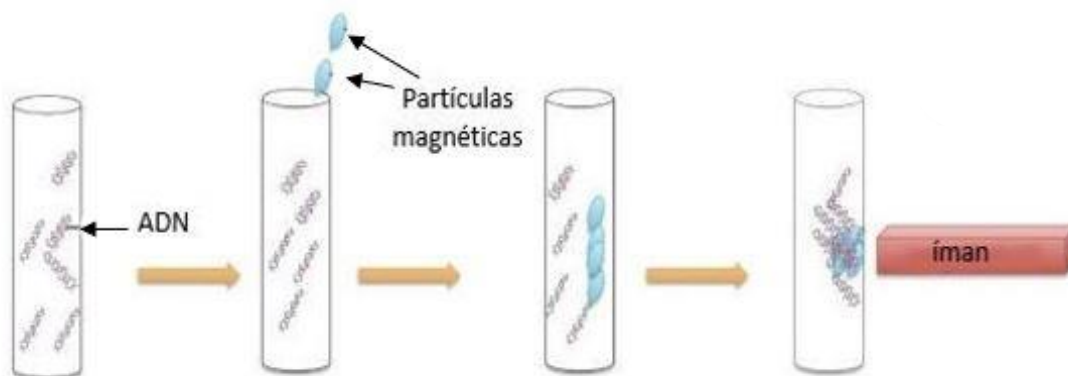


Figura 4 Captura de ADN por partículas magnéticas. Adaptado de Topçu, Aşır, & Türkmen, 2016

Assim, esta técnica, com a vantagem de poder ser um processo automatizado minimizando erros humanos e, mais importante, a contaminação, tem sido utilizada na extração de ADN de amostras forenses, tendo demonstrado sucesso em muitos estudos, quer com amostras difíceis quer com amostras mais comuns, como o sangue e sêmen (Nacham, Clark, & Anderson, 2016).

4.1. Extração de fase sólida de ADN de amostras difíceis

As amostras difíceis, como os ossos e dentes, dificultam o processo de extração de ADN devido à sua constituição morfológica. Mas, devido a essa mesma estrutura, são das amostras mais fiáveis em caso de desastres de massa, onde o ADN está mais protegido de todos os fatores externos que possam levar à degradação e a contaminações, embora não estejam imunes.

Em casos DVI, surge outra dificuldade na extração. As condições ambientais adversas, como a temperatura, pH, humidade, composição do solo e a presença de microrganismos, que têm interferência maior quando há atrasos na recolha dos restos das vítimas, alteram o osso/dente e consequentemente degradam o ADN endógeno, que já não existe em pouca quantidade. A escolha do método de extração é, por isso muito importante, uma vez que tem que se evitar tratamentos agressivos, com altas temperaturas e fortes detergentes, e ainda garantir que sejam eficientes na remoção de inibidores de PCR (Loreille, Diegoli, Irwin, Coble, & Parsons, 2007; Pajnič *et al.*, 2016; Rohland & Hofreiter, 2007; Walker, 2016).

Primeiramente o osso ou dente é limpo mecanicamente, normalmente com uma broca, e quimicamente com etanol e água destilada de modo a remover da superfície possíveis contaminações. Durante muitos anos, a extração de ADN de amostras difíceis recorria a uma desmineralização e lise celular combinadas com uma extração orgânica e filtração do pó, mas diversos estudos reportam o sucesso da extração sólida de ADN de amostras difíceis sem desmineralização, com a redução de inibidores de PCR co-extraídos em relação ao método orgânico com desmineralização (Caputo, Irisarri, Alechine, & Corach, 2013; Davoren *et al.*, 2007; Desmyter, De Cock, Moulin, & Noël, 2017; Iyavoo, Hadi, & Goodwin, 2013). Muitos protocolos ainda recorrem à desmineralização dos tecidos duros antes da moagem visto que, na maioria dos estudos, esta melhora o sucesso da análise. Contudo, alguns dos autores recorrem à desmineralização apenas quando o osso é antigo (Caputo *et al.*, 2013; Walker, 2016). Assim, para obter o pó de osso ou dente e se proceder à extração, é necessário a moagem do tecido duro, sendo que protocolos incluem o uso de azoto líquido para diminuir a temperatura durante o processamento e, deste modo, não causar danos no ADN durante a abrasão e corte da moagem (Pajnič, 2017).

As partículas magnéticas são utilizadas na genética forense devido ao seu tamanho reduzido que aumentam a área de contacto e aumentam a eficiência da captura de ADN. Por exemplo, o *kit PrepFiler BTA™ Forensic DNA Extraction* da *Thermo Fisher Scientific* utiliza partículas magnéticas para a extração sólida de ossos (*Bones*), dentes (*Teeth*) e adesivos (*Adhesive*) (Pajnič *et al.*, 2016). Este *kit* contém um tampão de lise que possui detergentes e sais caotrópicos, como o tiocianato de guanidina (GuSCN) ou o cloridrato de guanidina (GuHCl) que são muito eficientes na limpeza de ácidos nucleicos, o que permite a lise celular, desnaturando as proteínas e libertando o ADN para que este se ligue às partículas magnéticas e seja separado dos restantes constituintes celulares (Butler, 2012; Pajnič *et al.*, 2016; Witt, Neumann, Zierdt, Gébel, & Röscheisen, 2012).

O método de extração por *PrepFiler™* apresenta protocolos manuais e semi-automatizados. O protocolo semi-automatizado recorre ao sistema *AutoMate Express™* com os *kits PrepFiler Express™* e *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction* (Figura 5) e já demonstrou ser bastante eficiente na extração de ADN de diferentes tipos de amostra (Brevnov *et al.*, 2009; Davoren *et al.*, 2007; Mclamb, 2017). O *PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit* no *robot AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* não usa solventes agressivos, possuindo todos os reagentes em *cartridges* separados e protegidos, que apenas são expostos no momento da extração num ambiente fechado, sendo descartados após extração. O processo demora 30 minutos e utiliza apenas uma ponta por amostra para fazer a extração, reduzindo resíduos (Pajnič *et al.*, 2016). O processo automatizado reduz o risco de contaminação ao diminuir a intervenção humana e permite um aumento do volume de amostras a analisar em menos tempo, sendo que pode extrair até 13 amostras de cada vez (Witt *et al.*, 2012).



Figura 5 AutoMate Express™ com os kits PrepFiler Express™ e PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction. (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/product-images/4441763_650x600.jpg-650.jpg)

Na análise de todos os tipos de amostra, o método de extração tem um papel fundamental na quantidade e qualidade de ADN obtido e no sucesso de amplificação, sendo que nas amostras mais difíceis, obter extratos sem inibidores presentes e com quantidades de ADN suficientes é ainda mais complicado. Segundo o estudo de Stangegaard *et al.* (2013), em que se avaliou vários tipos de extração conforme a quantidade de ADN recuperado, o número de amostras com inibidores de PCR após extração e a qualidade dos perfis de STRs, o método de extração *PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit* no robot *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* demonstrou grande sucesso na obtenção dos perfis de STRs com grandes quantidades de ADN recuperado, apresentando, contudo, inibidores de PCR. Um outro estudo, mais recente, de Zupanič Pajnič *et al.* (2016), demonstra que através da extração com *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction* por *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* se conseguem obter bons resultados de análise de ADN de ossos contemporâneos e antigos, umas das amostras mais difíceis de analisar.

5. Amplificação e deteção de fragmentos

5.1. Amplificação

A reação em cadeia da polimerase (PCR), é uma das técnicas essenciais no processamento de ADN em genética forense. Este método permite obter uma maior quantidade de ADN a partir de uma quantidade inicial mais pequena, que muitas das vezes, principalmente em vestígios difíceis como os ossos, não seria suficiente para a análise total do ADN (Terra Pinheiro, 2010).

A PCR baseia-se num processo enzimático onde uma polimerase de ADN replica repetidamente uma certa região do ADN que é definida por dois *primers*. É um processo automatizado que envolve ciclos térmicos, é altamente específico e pode amplificar quantidades diminutas de ADN e ainda amplificar várias regiões específicas do ADN simultaneamente, um processo designado por reação de PCR em *multiplex* (Butler, 2012).

Para o sucesso da reação de PCR são necessários vários componentes, sendo dos mais importantes os dois *primers*, os dNTPs, blocos dos quatro nucleótidos necessários à construção das novas cadeias de ADN, e uma polimerase de ADN termoestável como a Taq polimerase, da bacteriana *Thermus Aquaticus*. Outros componentes como a solução tampão da PCR, que inclui, por exemplo, o MgCl₂ e o BSA (do inglês, *bovine serum albumin*), também são necessários para a reação de PCR, mas atualmente, todos os componentes são constituintes dos *kits* comerciais de amplificação (Butler, 2009). Este processo envolve três fases distintas por ciclo, nomeadamente, a desnaturação, ligação dos *primers* e extensão da cadeia. Primeiramente, a cadeia dupla de ADN é separada pelo calor, havendo em seguida uma diminuição da temperatura para que ocorra ligação dos dois *primers* (temperatura de *annealing*). Após a ligação, há um novo aumento de temperatura para que ocorra a extensão da cadeia a partir dos *primers* através da ação da polimerase de ADN. Assim por cada ciclo a molécula de ADN duplica (Butler, 2009).

Os *kits* de STRs funcionam melhor com quantidades de ADN entre os 0,5 e os 2,0 ng, sendo que se recomenda a utilização de 1 ng de ADN para que a amplificação dos STRs seja bem-sucedida. Ao adicionar à reação de PCR ADN em excesso, o sucesso da PCR pode ser comprometido, resultando um eletroforetograma inconsistente e com múltiplos artefactos que tornam difícil a sua interpretação. Em casos extremos haverá mesmo a inibição da reação de PCR. O mesmo se passa quando o material está presente em pouca quantidade, como acontece muitas vezes com os ossos, em que poderá ocorrer a perda de alelos de STR e o aparecimento de artefactos inespecíficos devido a efeitos estocásticos (Butler, 2012; Gouveia, 2015; Nicklas & Buel, 2003).

A quantificação da amostra extraída permite saber a quantidade de material inicial disponível e verificar se é suficiente ou se é necessário proceder à normalização das amostras, nomeadamente através de diluições (Butler, 2009).

5.2. Quantificação

A quantificação do ADN serve primeiramente para otimizar a reação de PCR. A partir da quantificação sabe-se a quantidade de ADN humano, algo que para o sucesso da identificação humana é importante, visto que na mesma amostra problema pode estar presente ADN que não o pretendido, como o de bactérias, plantas, animais, entre outros (Butler, 2012, Nicklas & Buel, 2003). Várias metodologias podem ser usadas para a quantificação de ADN na análise forense. Contudo esta precisa de ser específica para o ADN humano, o que torna algumas metodologias obsoletas para a área forense.

Inicialmente, a espectroscopia de fluorescência e ultravioleta eram os métodos mais usados na quantificação, não sendo estes específicos para o ADN. Com os avanços na análise de ADN, as sondas *PicoGreen* e *OliGreen* foram desenvolvidas para detetar ADN de cadeia dupla e de cadeia simples, respetivamente, mas estes métodos não eram também específicos para o ADN humano (Butler, 2012; Nicklas & Buel, 2003). Mais tarde, com o surgimento de novas técnicas mais específicas como o *Slot Blot*, o *AluQuant Human DNA quantification system*, o *End-Point PCR* e o *Real-time PCR*, tornou-se possível quantificar especificamente o ADN humano. Com a introdução do *Real-time PCR* em análise forense, esta tornou-se a principal opção para a quantificação de ADN (Alonso *et al.*, 2003; Butler, 2012; Nicklas & Buel, 2003).

O *Real-time PCR*, uma PCR quantitativa que analisa a mudança de fluorescência que resulta da amplificação ciclo-a-ciclo, foi primeiramente descrito no início dos anos 90 por *Higuchi* e co-investigadores. Esta técnica pode utilizar a sonda fluorogénica *TaqMan* ou corantes intercalados como o *SYBR Green*. A PCR quantitativa baseada em *SYBR Green* é muito específica para cadeia dupla de ADN, sendo que este deteta a formação de qualquer produto da amplificação (Alonso *et al.*, 2003; Butler, 2012).

A *TaqMan* é uma sonda com dois corantes fluorescentes detetáveis em diferentes comprimentos de onda. Esta sonda fluorogénica liga-se especificamente à cadeia de ADN molde, possuindo um “*Reporter*” na extremidade 5’ e um “*Quencher*” na extremidade 3’. Com o “*Reporter*” e o “*Quencher*” juntos, ou seja, com a sonda intacta, a fluorescência do *Reporter* é inibida pelo “*Quencher*” havendo transferência de energia entre os corantes. Durante a polimerização a partir do *primer*, a *Taq DNA* polimerase ao encontrar a sonda, adquire atividade exonuclease em 5’ degradando a sonda com o “*Reporter*” e o “*Quencher*” que, quando separados, emitem fluorescência. Assim, o método funciona através da medição da fluorescência emitida durante a atividade em 5’ da *Taq DNA* polimerase, usada na *Real Time PCR* (Alonso *et al.*, 2003; Butler, 2012).

Para a quantificação existem vários *kits* disponíveis como o *Plexor® HY System (PC)*, o *QuantiFiler™ Human DNA Quantification Kit (ABI)*, *QuantiFiler™ Duo DNA Quantification Kit (ABI)* e *QuantiFiler™ Trio DNA Quantification Kit (ABI)*, sendo este último o que mais informações fornece,

já que, para além da concentração de ADN total e masculino existente na amostra, permite estimar o estado de degradação da amostra através do índice de degradação (Butler, 2012; Vernarecci *et al.*, 2015).

O *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit (ABI)* deteta dois tipos de alvos autossómicos humanos, o *small autossomal target* (SA) e o *large autossomal target* (LA), em que o primeiro participa na medição da concentração de ADN e o segundo na medição do nível de degradação da amostra, que é obtido pelo razão entre o SA e o LA. Havendo degradação, esta estará primeiramente visível nos fragmentos maiores e assim o LA apresentará menor amplificação que o SA. O cromossoma Y também é um dos alvos deste *kit*, que permite saber a quantidade de ADN masculino. O *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit (ABI)* possui também um controlo interno de PCR, o IPC (do inglês, *Internal PCR Control*) útil na deteção de inibidores (Gouveia, 2015; ThermoFisher Scientific, 2017; Vernarecci *et al.*, 2015).

5.3. Inibidores da PCR e Desafios

Após a extração, a amostra de ADN a analisar deve estar purificada sem quaisquer interferentes para que a amplificação tenha sucesso. Mas muitos dos inibidores da PCR durante a lise celular e captação do ADN no processo de extração podem ser eluídos juntamente com o ADN, encontrando-se no produto extraído. Fatores intrínsecos e extrínsecos podem inibir a PCR, como os compostos húmicos presentes nos solos, a hemoglobina, as porfirinas e constituintes dos restos cadavéricos, como o colagénio e os metais pesados (Alaeddini, 2012; Butler, 2012; Vanek *et al.*, 2015).

Com os *primers* da amplificação marcados com fluorescência, os produtos de PCR são separados e detetados por eletroforese capilar (CE), sendo obtido um eletroforetograma com os vários picos de STRs. Na análise dos eletroforetograma podem surgir alguns desafios na interpretação (Terra Pinheiro, 2010).

Um dos fatores que pode alterar a obtenção de resultados é a presença de inibidores de PCR que podem afetar os nucleótidos, os *primers*, iões magnésio e a polimerase de ADN. Devido à presença de inibidores, pode ocorrer a perda de alelos de STR, obtendo-se um perfil incompleto, falsa homozigotia, ou mesmo a perda total dos STRs (Alaeddini, 2012).

Os vários desafios na obtenção de resultados surgem não só devido à presença de inibidores, mas também devido à presença de quantidades não adequadas de ADN, devido à degradação da amostra e, por vezes, devido a erros técnicos e instrumentais nos processos de análise (Butler, 2007, 2009; Terra Pinheiro, 2010).

O perfil resultante das amostras com presença de inibidores é semelhante ao das amostras degradadas, pois a redução da atividade da polimerase diminui a presença de cópias de ADN completas, o que leva a variações estocásticas e a artefactos inespecíficos (Budowle & van Daal, 2009; Butler, 2012). Estas variações apresentam-se como picos desequilibrados dos dois alelos de um *locus* heterozigótico (*locus imbalance*), perda de alelos (*allele drop-out*), perda de *loci* STR (*locus drop-out*) e em adição de alelos (*allele drop-in*). Por outro lado, podem surgir artefactos inespecíficos nos eletroforetogramas, como as bandas *stutter*, os artefactos derivados à adenilação incompleta e padrões trialélicos (Butler, 2009; Terra Pinheiro, 2010).

Devido a estes desafios de análise, os laboratórios devem estabelecer critérios internos para diferenciar um “verdadeiro” alelo de variações estocásticas e artefactos. São definidos limites de deteção medidos em unidades relativas de fluorescência, RFU (do inglês, *Relative Fluorescent Units*), como o limiar analítico e o estocástico (Terra Pinheiro, 2010). O limiar analítico é determinado pelo sinal mínimo em que os picos são distinguidos do ruído de fundo, pelo que acima deste valor, os resultados são interpretados pelo *software* como um resultado da análise. O limiar estocástico é outro patamar de análise acima do qual os efeitos estocásticos são mínimos e não deverá ocorrer *allele drop-out*. Acima deste limiar conseguem-se evitar falsas homozigotias, ou seja, na presença de um heterozigótico, um dos alelos do par pode exibir sinal e o outro não ser detetado podendo ser interpretado como um homozigótico, mas se o sinal do alelo detetado se encontrar abaixo deste limite, não se pode excluir a ocorrência de um *allele drop-out* (Bregu *et al.*, 2013; Butler, 2009; Lareu, 2013).

Os perfis de mistura são também um desafio na interpretação dos resultados de análise. No eletroforetograma podem aparecer mais do que dois picos por *locus* com a mesma intensidade ou desequilibrados que podem ser devidos à existência de mais do que um contribuinte. Em muitos casos de misturas, estas podem ser confundidas e interpretadas erradamente como bandas *stutter* (Butler, 2009; Oorschot, Ballantyne, & Mitchell, 2010).

5.4. Separação Eletroforética

A eletroforese é uma técnica analítica de separação de moléculas através das diferenças de velocidades de migração num campo elétrico. Os fragmentos de ADN mais pequenos movimentam-se mais facilmente através dos poros do polímero, enquanto que os fragmentos maiores ficam mais retidos levando mais tempo para migrarem. Essa migração ocorre quando estas moléculas estão num eletrólito através do qual passa uma corrente. As moléculas de ADN, devido aos seus grupos fosfato, são carregadas negativamente, o que as faz migrar do polo negativo, o cátodo, para o polo positivo, o ânodo, quando sujeitas a uma voltagem (Butler, 2009; Topçu, Aşır, & Türkmen, 2016).

A eletroforese em gel ainda é utilizada, mas devido a todas as vantagens, como a melhor dissipação do calor formado pelo movimento de íões no campo elétrico, a eletroforese capilar apresentada pela primeira vez em 1988 por Kasper e Cohen, é a mais usada em análise forense de ADN (Butler, 2009; Topçu *et al.*, 2016).

A eletroforese capilar, CE, é uma técnica que utiliza um capilar estreito que separa eficientemente pequenas quantidades de amostra, o que em casos forenses, é vantajoso, uma vez que pode existir a necessidade de uma nova análise da mesma amostra e esta pode possuir diminutas quantidades de ADN. Tem uma boa resolução, com pouco tempo de corrida, é automatizada e tem a capacidade de detetar *multiplex* de STRs marcados com fluorescência (Butler, 2009; Kim, Heo, & Seo, 2018).

A CE automatizada, utiliza um canal capilar com diâmetro entre os 50 e 100 µm e uma distância de injeção e deteção de 25 a 75 cm. Necessita de um polímero, de dois eletrodos ligados à fonte de alimentação de alta tensão, de dois compartimentos para os tampões de eletroforese, de uma zona de excitação pelo laser e de um detetor de fluorescência. Possui ainda um amostrador automático para os produtos de PCR e um computador com o *software* necessário para o controlo das condições da CE (Butler, 2012; Kim *et al.*, 2018).

Inicialmente, neste tipo de eletroforese, tem que ocorrer a entrada do ADN no capilar. A injeção eletrocinética é o método utilizado, onde é aplicada uma voltagem na amostra líquida na extremidade do capilar. A voltagem positiva atrai as moléculas negativas de ADN, que estão em pH neutro, para dentro do capilar. A formamida é um componente utilizado na CE, para facilitar a injeção eletrocinética. Os produtos de PCR contêm sais iónicos que podem competir com o ADN no capilar, e a formamida, como agente desnaturante, diminui os níveis de sais e desnatura a cadeia dupla de ADN. A formamida altamente desionizada (*highly deionized, Hi-Di™*) *formamide* (ABI) é das mais usadas nos laboratórios forenses (Butler, 2012).

Após a injeção eletrocinética, os produtos de PCR são movidos pelo canal capilar onde são separados conforme o seu tamanho. O laser incide no capilar numa posição fixa onde os fragmentos mais pequenos de ADN são iluminados primeiro, visto que o polímero altera as velocidades dos fragmentos tendo em conta o seu tamanho. Os produtos de PCR marcados com fluorescência separados são em seguida detetados com alta sensibilidade pelo detetor, onde ocorre uma nova separação conforme as intensidades de fluorescência observadas. O processo automatizado resulta por fim num eletroforetograma, onde se observa a relação entre os tamanhos dos fragmentos e as suas intensidades relativas de fluorescências, as RFU (Figura 6), (Butler, 2012; Terra Pinheiro, 2010).

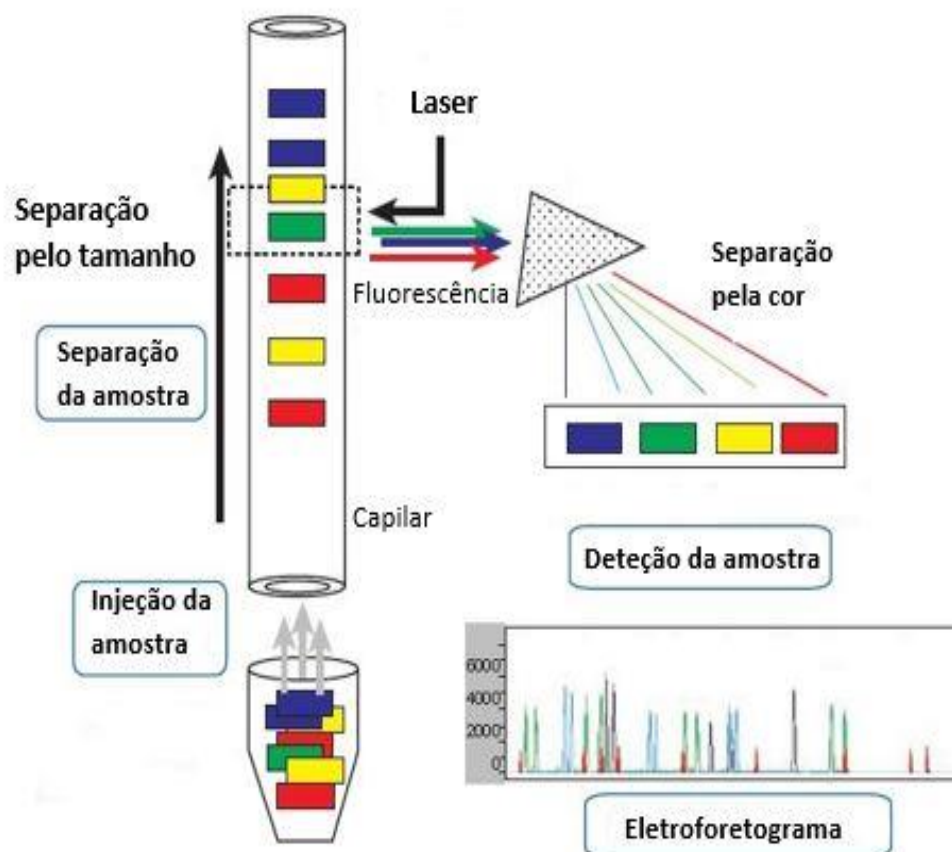


Figura 6 Eletroforese Capilar. Adaptado Butler, 2012.

O tamanho dos fragmentos é obtido através do *size standard*, fornecido pelo *kit*, que migra juntamente com os produtos de PCR. O tempo de migração de cada amostra é convertido em tamanho em pares de bases, através de uma curva de calibração que é construída com base no tempo de migração dos fragmentos do *size standard*, que possuem tamanhos conhecidos. O eletroforetograma é utilizado para construir o perfil de STRs de ADN através da comparação com o *ladder* alélico também fornecido pelo *kit*, em que os perfis de STR são conhecidos. O resultado final é um perfil de STRs único, sendo muito útil na identificação em casos forenses, visto que este tipo de marcador genético é bastante discriminativo (Butler, 2012; Terra Pinheiro, 2010).

Objetivo

Em resposta a situações em que a amostra biológica possui pouca quantidade de ADN, como é o caso dos ossos ou dentes, este trabalho teve como objetivo melhorar o procedimento semi-automatizado já existente no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF) em Coimbra e utilizado em muitos outros laboratórios forenses, de modo a recuperar o máximo de material genético a partir de amostras difíceis, como ossos e dentes.

Com a implementação deste novo protocolo semi-automatizado pretende-se aumentar as taxas de sucesso de obtenção do perfil de amostras difíceis, amostras que podem ser em grande quantidade em casos de DVI, onde a existência de um método automatizado e o mais eficiente possível é crucial para diminuir o tempo de análise e assim dar resposta às famílias das vítimas.

Procedimento experimental

1. Amostragem

Para a realização deste estudo foram utilizadas 11 amostras ósseas vestígio disponibilizadas pelo Serviço de Genética e Biologia Forense do INMLCF de Coimbra, entre as quais 1 dente e 10 ossos (Tabela 1). As amostras foram escolhidas independentemente do sexo e idade do indivíduo, do tempo *post-mortem* e da exposição às condições ambientais externas.

Tabela 1 Tipo de amostras ósseas

Tipo de tecidos ósseos	Amostras
Crânio	A
Fémur	B, C, D, E, F, G, H, I, K
Dente molar	J

2. Preparação das amostras

Antes da preparação de cada amostra óssea, a cabine de fluxo laminar foi descontaminada durante aproximadamente 20 minutos com recurso a luz UV.

No osso ou dente foi efetuada a limpeza primária com auxílio de uma escova de polir com serra elétrica e cortada uma secção com cerca de 4x4 cm, seguida de uma limpeza química através de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) durante 5 minutos seguido de mais 5 minutos em água destilada. Após a limpeza, as amostras foram cortadas em fragmentos mais pequenos e colocados nos viais devidamente identificados (Figura 7). Os viais montados são compostos por um cilindro em plástico ou aço com dois topos distintos que fecham o cilindro e uma barra metálica no interior, que servirá como batente.



Figura 7 Viais montados utilizados na moagem do material biológico em azoto líquido. Adaptado de (Corte-Real & Porto, 2015)

Quando não se procedeu imediatamente à pulverização dos fragmentos estes foram armazenados a $\pm -80^{\circ}\text{C}$.

Os vials foram colocados em azoto líquido no moinho *SPEX Sample Prep Freezer/Mill 6770* e procedeu-se à sua pulverização. Com a amostra em pó, numa *workstation* devidamente descontaminada com luz UV, foi pesado para cada tubo *PrepFiler™ Bone and Teeth Lysate*, fornecido pelo *kit* de extração, a quantidade de pó necessária para a extração de ADN com o *kit PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction*, na sua versão normal ou modificada, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 Peso de amostra conforme o tipo de extração

Peso máximo (mg)	Tipo de extração
50	Extração <i>PrepFiler Express BTA™</i> normal (N)
150	Extração <i>PrepFiler Express BTA™</i> modificada (M)

Concluídas as pesagens, as amostras foram mantidas a $\pm -20^{\circ}\text{C}$ até ser efetuada a extração.

Após a utilização da *workstation* e da cabine, estas foram devidamente limpas e descontaminadas, sendo que a cabine de fluxo laminar foi descontaminada entre cada amostra processada.

3. Extração

O método de extração baseado no *kit PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction* (ABI) com *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* (ABI), engloba três fases distintas: a lise celular, a remoção do substrato da amostra lisada e a extração automática. A extração automática consiste na ligação do ADN às partículas magnéticas através de uma solução com altas concentrações de sais caiotrópicos e baixo pH, formando um complexo de partículas magnéticas e ADN, que é purificado através de várias lavagens até o ADN ser separado das partículas magnéticas e eluído através do tampão de eluição.

A extração descrita anteriormente, realizou-se conforme as indicações do guia de utilização do *kit* para o protocolo *PrepFiler Express BTA™* normal (ThermoFisher Scientific, 2012). Para o protocolo *PrepFiler Express BTA™* modificado seguiram-se as indicações conforme o guia de utilização do *kit*, mas com o triplo da quantidade de pó de osso.

Para a lise celular, numa *workstation* previamente descontaminada, preparou-se a solução de lise *PrepFiler BTA* para cada protocolo num tubo de *falcon* autoclavado conforme a Tabela 3. A cada tubo *PrepFiler™ Bone and Teeth Lysate Tube* com amostra foi adicionado o volume de solução de lise indicado para cada protocolo. As amostras foram incubadas *overnight* a 56°C e com agitação de 1100 rpm.

Foram preparados controlos de extração nos tubos *PrepFiler™ Bone and Teeth Lysate Tube* para monitorização do processo. O controlo negativo foi preparado apenas com o volume de reagentes, e o controlo positivo foi preparado com o volume de reagentes adicionado a um corte de uma amostra de sangue de referência em papel FTA®.

Tabela 3 Preparação da solução de lise para a extração por *PrepFiler™ BTA Express* conforme o protocolo

Protocolo	<i>PrepFiler BTA™ Lysis Buffer</i> (μl)	DTT*(1M) (μl)	Proteinase K (μl)	Volume final solução de lise (μl)
BTA (N)	220	3	7	230
Modificado (M)	660	9	21	690

*DTT do inglês *Dithiothreitol*

Após a lise, procedeu-se à centrifugação por 90 segundos a 10,000xg e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo *PrepFiler™ Sample Tube*, fornecido pelo *kit*. Neste passo procedeu-se cuidadosamente para não existir contacto com o sedimento de modo a que as partículas de pó da amostra não fossem aspiradas e posteriormente dificultassem o processo automatizado.

Verificou-se se o volume do sobrenadante transferido era suficiente para a realização do método automatizado, (Tabela 4).

Tabela 4 Volume de sobrenadante necessário conforme o protocolo

Protocolo	Método automatizado	Volume substrato necessário (μl)
BTA(N)	<i>PrepFiler BTA Express</i>	200
Modificado (M)	<i>PrepFiler Express</i>	500

Preparou-se o robot *AutoMate Express™ Instrument* com as *AutoMate Express™ Tips and Tip Holders*, as *PrepFiler Express™ Cartridges* e os *PrepFiler™ Elution Tubes*, conforme o guia de utilização (ThermoFisher Scientific, 2018), em que o Protocol Card diferiu consoante o volume de eluição final pretendido, (Tabela 5). Este sistema automático de extração tem capacidade para extrair 13 amostras de uma vez, incluindo os controlos positivo e negativo, que foram adicionados por cada processo de extração.

Colocaram-se os tubos *PrepFiler™ Sample Tube* com as amostras no robot, iniciou-se a extração automática com duração de 30 minutos.

Tabela 5 Volume de eluição conforme o Protocol Card

Protocol Card	Volume de eluição (µl)
<i>PrepFiler Express™ & PrepFiler Express BTA™ Protocol Card V 1.0</i>	50
<i>PrepFiler Express™ & PrepFiler Express BTA™ Protocol Card V 1.1</i>	20

Após os 30 minutos as amostras nos *PrepFiler™ Elution Tubes* foram armazenadas a \pm 25°C até à sua quantificação e procedeu-se à limpeza do robot.

4. Quantificação

O *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit (ABI)* quantifica simultaneamente o ADN total humano e ADN masculino presente na amostra, através de sondas *TaqMan®*. Deteta dois tipos de alvos autossómicos, *small autossomal (SA)* com 80 pares de bases (bp) e marcada com o fluoróforo VIC™ e o *large autossomal (LA)* com 214 bp e marcada com o fluoróforo ABY™. Para o ADN masculino tem como alvo o cromossoma Y, com 75 bp e marcada com o fluoróforo FAM™.

O *Quantifiler™ Trio* permite saber a qualidade do ADN através da determinação dos níveis de degradação e de inibição tornando-o útil em casos de amostras difíceis como os ossos. Os níveis de degradação são calculados através da razão entre a quantidade de SA com a quantidade de LA, em que uma amostra terá maior degradação se o alvo LA estiver em menor quantidade. A presença de inibidores é controlada pelo controlo de PCR interno (IPC), uma molécula de ADN sintética com 130 bp e fluoróforo JUN™, presente no *kit*.

Com recurso ao *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit (ABI)* procedeu-se à quantificação por *Real-Time PCR* de todas as amostras no *ABI™ 7500 Real-Time PCR System* com o software *HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2 (ABI)* conforme as recomendações do fabricante descritas no manual de utilização (ThermoFisher Scientific, 2017).

Inicialmente procedeu-se à construção de uma curva padrão. Foram preparadas, a partir de uma solução mãe de 100 ng/µl fornecida pelo *kit (Quantifiler™ THP DNA standard)*, diluições em série com concentrações de 50; 5; 0,5; 0,05 e 0,005 ng/µl como descrito na Tabela 6. As diluições foram realizadas com um tampão de diluição do *kit, Quantifiler™ THP Dilution Buffer*.

Tabela 6 Preparação das diluições em série a partir da solução de 100 ng/ μ l

	STD1 50 ng/ μ l	STD2 5 ng/ μ l	STD3 0,5 ng/ μ l	STD4 0,05 ng/ μ l	STD5 0,005 ng/ μ l
Volume de standard (μ l)	10 de 100 ng/ μ l	10 de STD1	10 de STD2	10 de STD3	10 de STD4
Volume de tampão de diluição (μ l)	10	90	90	90	90
Fator de diluição	2 X	10 X	10 X	10 X	10 X

A partir dos *standards* (STD) com concentrações conhecidas é construída a curva padrão que relaciona as concentrações iniciais de ADN dos STDs com o número de ciclos de PCR necessários para que a curva de amplificação ultrapasse o *threshold*. Assim, para as amostras desconhecidas, o número de ciclos necessários para que se atinja o limite mínimo de detecção de fluorescência é convertido em concentrações iniciais de ADN, em que quantos mais ciclos forem necessários menor é a concentração de ADN inicial.

Em cabine de fluxo laminar previamente descontaminada, num tubo de 1,5 ml foi preparada a mistura de *Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix* e *Quantifiler™ Trio Primer Mix* conforme a Tabela 7. Em placa de 96 poços, *MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plate*, foram colocados em cada poço 18 μ l da mistura.

Tabela 7 Quantidades de componentes do *Quantifiler™ Trio* para o Real Time PCR

	Primer Mix	PCR Reaction Mix	Volume final
Por amostra (μ l)	8	10	18

Numa workstation descontaminada com luz UV, em cada poço da placa com mistura adicionaram-se 2 μ l de ADN, de controlo positivo ou de *low*-TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) para o controlo negativo, perfazendo um total de 20 μ l por cada amostra. Ao ensaio foram adicionados controlos positivos de quantificação de 0,1 ng/ μ l, 10 ng/ μ l e 40 ng/ μ l e um controlo negativo de quantificação.

A placa completa foi selada com um filme adesivo *MicroAmp™ Optical Adhesive Film*, cuidadosamente para evitar impressões digitais na superfície que dificultassem a quantificação. Verificou-se a existência de bolhas e centrifugou-se a placa 20 segundos a 3000 rpm.

Colocou-se a placa no aparelho *7500 Real Time PCR* preparado para o *kit Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit* conforme o guia de utilização (ThermoFisher Scientific, 2017), onde a PCR quantitativa ocorreu com uma desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos seguida de ligação dos *primers* por 9 segundos a 95°C e extensão por 30 segundos a 60°C, por 40 ciclos.

Por fim, foram analisados os dados da quantificação, sendo que nos casos em que as amostras apresentavam um grau elevado de degradação e baixa concentração de ADN, estas não seguiram para amplificação.

Após a quantificação das amostras a placa foi descartada.

5. Amplificação

Para a amplificação das amostras utilizaram-se os *kits GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (ABI)* e *PowerPlex® Fusion 6C System (PC)* conforme os guias de utilização (Promega Corporation, 2017; ThermoFisher Scientific, 2016), que tendo *loci* comuns, foram comparados os resultados da mesma amostra aumentando a confiança nos resultados.

Para cada *kit* de amplificação, numa cabine de fluxo laminar descontaminada previamente, foi preparada a mistura de solução de reação num tubo de 1,5 ml com os volumes necessários de reagentes para a PCR, consoante o *kit*. Foram preparados e identificados previamente tubos de 0,2 ml, nos quais foi distribuído o volume de 10 µl da mistura em cada um, Tabela 7.

De acordo com os dados da quantificação, foram transferidos de 1 a 15 µl de volume de amostra extraída para os tubos com a mistura, de modo a se obter um *input* de 1,0 ng, quando possível. A cada tubo foi adicionado, se necessário, o volume de *low-TE* ou água (*Water, Amplification Grade*, fornecida pelo *kit PowerPlex® Fusion 6C*) para perfazer o volume final de 25 µl como representa a Tabela 7.

Tabela 8 Quantidades de componentes de PCR por amostra com *kit GlobalFiler* e *PowerPlex Fusion 6C*

<i>GlobalFiler</i>	<i>GlobalFiler™ Primer Set</i>	<i>GlobalFiler™ Master Mix</i>	Volume da mistura (µl)	Volume final (µl)
	2,5	7,5	10	25
<i>PowerPlex Fusion 6C</i>	<i>PowerPlex® Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i>	<i>PowerPlex® Fusion 6C 5X Master Mix</i>	Volume da mistura (µl)	Volume final (µl)
	5	5	10	25

Após a sua preparação, as amostras foram colocadas num termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* ou *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* com o programa indicado para o *kit GlobalFiler™ PCR Amplification* ou *PowerPlex® Fusion 6C*, como representado nas Tabelas 8 e Tabela 9, respetivamente.

Tabela 9 Ciclos Térmicos *kit GlobalFiler™ PCR Amplification*

Iniciação	29 Ciclos		Extensão final	Final
95°C 1 minuto	Desnaturação	Ligação de <i>primers</i> / extensão	60°C 10 minutos	4°C ∞
	94°C 10 segundos	59°C 90 segundos		

Tabela 10 Ciclos Térmicos *kit PowerPlex® Fusion 6C System*

Iniciação	29 Ciclos		Extensão final	Final
96°C 1 minuto	Desnaturação	Ligação de <i>primers</i> / extensão	60°C 10 minutos	4°C ∞
	96°C 5 segundos	60°C 1 minuto		

Após a PCR, as amostras foram armazenadas a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ até se proceder à separação do produto amplificado.

6. Separação eletroforética

Para a separação dos produtos amplificados, procedeu-se à eletroforese capilar (CE) no sequenciador *ABI 3500 Genetic Analyser* com polímero POP-4 e capilar de 36 cm, e matriz J6 (*GlobalFiler™ PCR Amplification*) e matriz Promega J6 (*PowerPlex® Fusion 6C*), com o *3500 Data Collection v2 Software* conforme o protocolo de utilização de cada *kit*.

Numa workstation descontaminada, preparou-se a mistura de 9,5 μl *Hi-Di™ formamide (ABI)* e 0,5 μl *size standard*, para cada *kit*. Foi transferido para cada poço da *MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate* 10 μl da mistura. A cada poço com mistura foi adicionado 1 μl de produto amplificado/*Ladder* Alélico específico a cada *kit*, Tabela 10.

Tabela 11 Preparação da separação dos produtos amplificados. Valores em µl por amostra.

	<i>GlobalFiler</i>		<i>PowerPlex Fusion 6C</i>	
Reagentes	<i>Hi-Di™ Formamide</i>	<i>Size standard LIZ 600</i>	<i>Hi-Di™ Formamide</i>	<i>Size standard WEN Internal Lane Standard 500</i>
Volume (µl)	9,5	0,5	9,5	0,5
<i>Ladder</i> alélico* / produto amplificado	<i>GlobalFiler™ Allelic Ladder</i>		<i>PowerPlex® Fusion 6C Allelic Ladder Mix</i>	
Volume (µl)	1		1	

*O *Ladder* alélico é apenas inserido num poço da placa, sendo tratado como uma amostra.

As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos e colocadas no sequenciador automático, com tempo de injeção padrão de 15 segundos, e quando necessário, reaplicadas com 40 segundos ou 4 µl de amostra e 40 segundos de tempo de injeção.

A análise dos resultados de CE foi feita com recurso ao *software GeneMapper™ ID-X Software v1.4*, com limiar analítico de 100 RFU para o *GlobalFiler™* e 125 RFU para o *PowerPlex® Fusion 6C*.

Resultados e Discussão

A extração de ADN das amostras forenses é um passo crítico para o sucesso da análise do perfil de ADN, sendo muito importante a escolha do método de extração.

Neste estudo dois tipos de protocolos de extração automatizados (*PrepFiler Express™ & PrepFiler Express BTA™ Protocol Card V 1.0* e *PrepFiler Express™ & PrepFiler Express BTA™ Protocol Card V 1.1*, ABI) foram testados e comparados, não só a partir da avaliação dos níveis de ADN recuperado das amostras ósseas na extração, mas também a partir da avaliação da presença de inibidores de PCR e dos perfis de STRs obtidos.

As amostras utilizadas foram maioritariamente ossos, mais precisamente fémures, o tipo de amostra óssea que vários estudos publicados recomendam em casos de DVI, estando estas identificadas de A a K, sendo o “.c” o número da porção do mesmo osso. Pertenciam a diferentes indivíduos, sendo que para este estudo não foram considerados o tempo *post-mortem*, idade e condições externas a que os indivíduos foram sujeitos. Todas as amostras foram tratadas na rotina de análise do Laboratório de Biologia e Genética Forense do INMLCF-Coimbra.

A quantidade de pó de osso ou dente de 50 mg é a quantidade padrão dos protocolos de utilização do *kit* de extração *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kit*, existindo também outros estudos que utilizam quantidades diferentes (Buś, Bogdanowicz, & Vödrös, 2013; Caputo *et al.*, 2013; Filippini, 2010). De modo a aumentar a eficiência da extração de amostras difíceis, o laboratório de Biologia e Genética Forense do INMLCF-Coimbra também recorre à utilização de 150 mg de pó de osso ou dente, sendo que este utiliza o triplo dos volumes de reagentes, o que pode ser uma desvantagem.

O protocolo modificado, com o triplo de quantidade de pó de amostra, foi realizado apenas para algumas amostras. A escolha das amostras para a realização do protocolo modificado dependeu dos resultados obtidos na extração com os protocolos normais N50 e N20, e também da quantidade de amostra em pó disponível. Com o protocolo modificado, foram extraídas as amostras que apresentam níveis de ADN mais baixos com os protocolos normais. Todas as amostras tratadas, como já foi referido, faziam parte da rotina do laboratório e sendo vestígios limitados é necessária uma gestão da amostra disponível e dos métodos e reagentes a utilizar.

Após a extração por *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kit* com *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System*, o ADN recuperado foi quantificado por *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit*.

A PCR deverá iniciar com valores de input entre os 0,5 e 2,0 ng, sendo o ótimo 1 ng. Contudo, para muitas amostras a concentração obtida não permitiu um *input* dentro desse intervalo, o que poderá levar à presença de artefactos na obtenção dos perfis de STRs. No entanto, a

bibliografia também recomenda que se finalize a análise, ou seja, se proceda à amplificação e sequenciação das amostras mesmo com diminutas quantidades de ADN (Pajnič *et al.*, 2016).

Através da quantificação das amostras, procede-se à sua normalização sendo calculado o volume necessário de cada amostra para que o *input* de ADN na reação de PCR seja de 1 ng. Amostras com menos de 0,004 ng/μl de ADN recuperado pelo protocolo padrão, ou seja, com *inputs* inferiores a 0,060 ng, não foram amplificadas. Para o protocolo teste com volume de eluição de 20 μl, todas as amostras foram amplificadas e os perfis obtidos.

Para algumas amostras foi ultrapassado propositadamente o *input* teórico de 1 ng pretendendo-se com isso contrariar a degradação evidenciada pelo ID, assim, para amostras com elevada degradação foi transferido 15 μl de ADN, sendo que neste caso, as quantidades de ADN superiores poderão levar à obtenção de extra picos nos perfis.

Após a amplificação por PCR, os produtos amplificados por cada *kit* de amplificação foram separados e analisados por CE pelo sequenciador *ABI 3500 Genetic Analyser* com o *3500 Data Collection v2 Software*. Cada amostra foi amplificada, quando possível, com os dois *kits* de amplificação, uma vez que para o protocolo de 20 μl de volume de eluição era necessário extrair uma amostra para cada *kit* de amplificação, visto que a partir do volume total disponível após quantificação (18 μl) apenas se consegue realizar uma PCR com o volume de 15 μl, o volume máximo permitido e mais utilizado em amostras difíceis. Com a utilização do protocolo de 50 μl de volume de eluição, existe a vantagem de apenas uma amostra extraída ser suficiente para a realização das duas amplificações.

O *kit GlobalFiler™ PCR Amplification* foi o escolhido para amplificar as amostras em que apenas foi possível uma amplificação, uma vez que este é descrito na bibliografia como muito sensível, com elevadas taxas de recuperação de alelos em amostras degradadas e com baixo nível de ADN presente em relação ao *kit PowerPlex® Fusion 6C System* (Buš *et al.*, 2013; Holmes *et al.*, 2018; Lin, Li, & Ip, 2017).

A Tabela 12 demonstra os dados referentes à quantidade de ADN recuperado (ng/μl) por amostra, o índice de degradação (ID) e o IPC para controlo dos inibidores presentes, divididos conforme o tipo de extração (Normal ou Modificado) e protocolo utilizado (volume de eluição 50 μl ou 20 μl). Esta tabela apresenta também a variação percentual de ADN recuperado entre o protocolo teste e o protocolo padrão e as pesagens de pó utilizadas para a extração.

As condições de injeção entre os protocolos de algumas amostras foram diferentes e, alterações neste parâmetro conduzem a diferentes taxas de sucesso na obtenção de perfil. No entanto, as amostras que não foram analisadas com as mesmas condições entre os protocolos, demonstraram que não era necessária nova injeção no CE, pois através dos eletroforetogramas obtidos, estes previam-se semelhantes, gerindo-se o material e tempo.

Tabela 12 Quantificações de ADN das amostras conforme o tipo de extração Normal ou Modificada (*) com 50 µl ou 20 µl de volume de eluição. ID (índice de degradação, calculado por $\frac{[SA]}{[LA]}$), IPC (internal PCR control), Vm (Valor médio) e % (variação percentual entre os protocolos 50 e 20 µl, calculada por $\frac{V_{mf}-V_{mi}}{V_{mi}} \times 100$).

50 µl					20 µl					
Amostra	Quant. (ng/µl)	ID	IPC	Vmi ADN	Amostra	Quant. (ng/µl)	ID	IPC	Vmf ADN	%
A.c1 33mg	0,0057		27,883	0,0068	A.c5 41mg	0,0199		27,981	0,0199	+192,7
A.c2 64mg	0,0079	25,519	27,840							
A.c3 45mg	0,004	3,6018	27,973	0,004	A.c6 36mg	0,0042	2,609	27,768	0,0042	+5
A.c4 80mg	0,004	1,5378	28,335							
A.c9 * 180mg	0,0066		27,908	0,0066	A.c7* 143mg	0,05	73.217	27,695	0,3535	+5256
					A.c8* 189mg	0,657	106.48	27,637		
B.c1 67mg	0,0595	2,006	27,922	0,0504	B.c3 46mg	0,1799	3,290	27.615	0,1799	+256,9
B.c2 44mg	0,041	1,844	27,584							
C.c1 62mg	0,028	1,710	27,872	0,0247	C.c3 59mg	0,0266	5,566	27.589	0,0266	+7,7
C.c2 54mg	0,021	1,832	27,934							
D.c1 74mg	9,334	0,871	28,630	7,8337	D.c3 79mg	32,265	1,704	29.552	32,265	+311,9
D.c2 65mg	6,334	0,736	28,385							
E.c1 55mg	7,705	0,640	28,434	9,8755	E.c3 65mg	36,218	1,353	31.208	36,218	+266,8
E.c2 74mg	12,046	0,708	28,590							
F.c1 61mg	0,0008	2,158	27,864	0,0008	F.c2 56mg	0,0025	36,758	27.761	0,0025	+212,5
					F.c3* 134mg	0,0037	3.544	27,729	0,0041	
					F.c4* 148mg	0,0044	1.993	27,823		
G.c1 56mg	0,0022	1,671	29,763	0,0027	G.c5 58mg	0,0096	4,023	28,025	0,0084	+211,1
G.c2 47mg	0,0032	1,960	29,455		G.c6 55mg	0,0073	2,404	28,170		
G.c3* 192mg	0,0043	2,154	27,638	0,0042	G.c7* 147mg	0,0071	1,694	28,117	0,0095	+126,2
G.c4* 207mg	0,0042	2,128	27,652		G.c8* 168mg	0,0118	2,872	27,893		
H.c1 56mg	0,0154	1,912	27,699	0,0154	H.c2 51mg	0,0315	1,540	27,795	0,0431	+179,9
					H.c3 62mg	0,0546	1,674	27,854		
I.c1 66mg	0,0556	5,0471	27,881	0,0455	I.c3 47mg	0,0987	4,8017	27,598	0,1197	+163,4
I.c2 55mg	0,0353	3,766	28,206		I.c4 54mg	0,1406	5,3026	27,645		
J.c1 68mg	0,0095	1,7045	27,809	0,0095	J.c2 56mg	0,0107	1,6638	27,727	0,013	+36,8
					J.c3 53mg	0,0153	1,3984	27,783		
K.c1* 167mg	0,0971	6,7126	27,348	0,181	K.c4* 180mg	0,7113	6.5739	27.130	0,6823	+277
K.c2* 150mg	0,1739	9,2099	27,189		K.c5* 235mg	0,6532	5.8463	26.977		
K.c3* 162mg	0,2720	8,768	27,270							

A Tabela 13 representa os resultados obtidos para os marcadores genéticos presentes nos kits *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* e *PowerPlex® Fusion 6C System* para cada amostra conforme o protocolo realizado, sendo que foram cruzados e complementados os perfis obtidos por cada *kit* de amplificação, formando perfis consenso. Nesta tabela são também referidas as condições de injeção de cada amostra na CE, que podem ser alteradas para recuperar o máximo de alelos possíveis. Quando os perfis de ADN das amostras se apresentavam incompletos foram aumentados os seus tempos de injeção de 15 segundos (15") para 40 segundos (40"), e se ainda necessário, aumentou-se o *input* de produto amplificado para 4 µl em 40 segundos de injeção (4µl em 40"). O aumento do tempo de injeção aumenta o produto de PCR no polímero o que aumenta a eficiência da deteção de fragmentos.

Tabela 13 Perfis consenso obtidos para cada amostra conforme o protocolo realizado. Com **verde** para o locus completo, **amarelo** para allele drop-out e **vermelho** para locus drop-out. N50 (protocolo normal com 50 µl de volume de eluição); N20 (protocolo normal com 20 µl de volume de eluição); M50 (protocolo modificado com 50 µl de volume de eluição); M20 (protocolo modificado com 20 µl de volume de eluição).

		D 3 S 1 3 5 8	D 1 6 S v W A	C S F 1 3 P O X	Y i n d A E	D 8 S 1 1 S 7 9	D 2 1 8 S 1 1 1	D 1 Y 2 S 3 4 3 3	D 9 2 S S 4 3 0 1	D 2 S 5 3 7 A	D 1 D 3 8 7 0	D 1 S S S S E 4 5 6 8	D 0 1 1 S 1 S 2 3 4 5 6 1	D 1 2 S 1 S 3 3 7 7 0	D 2 Y S S 5 5 7 7 0	P E N T A A D E	P E N T A A D E	
A N50	40"																	
A N20	4 µl- 40 "																	
A M50	4 µl- 40 "																	
A M20	4 µl- 40 "																	
B N50	40"																	
B N20	15"																	
C N50	40"																	
C N20	40"																	
D N50	15"																	
D N20	15"																	
E N50	15"																	
E N20	15"																	
F N20	4 µl- 40 "																	
F M20	4 µl- 40 "																	
G N20	4 µl- 40 "																	
G M50	4 µl- 40 "																	
G M20	4 µl- 40 "																	
H N50	15"																	
H N20	40"																	
I N50	40"																	
I N20	40"																	
J N50	40"																	
J N20	40"																	
K M50	15"																	
K M20	40"																	

A amostra A, como se verifica na Tabela 11, obteve níveis de ADN baixos para ambos os protocolos, contudo a diferença entre as quantidades de ADN recuperado dos protocolos é observável. A amostra A representa um crânio, sendo que as porções A.c1, A.c2 e A.c5 foram preparadas com pó da zona parietal do crânio, enquanto que as porções A.c3, A.c4 e A.c6 foram preparadas com pó da zona frontal.

Na zona frontal do crânio os resultados diferem dos obtidos na zona parietal do crânio. Embora seja o mesmo osso, para a zona frontal, as porções A.c3 e A.c4 extraídas com o protocolo N50 e a A.c6 extraída com o protocolo N20, apresentam níveis semelhantes (+ 5%) e muito baixos de ADN, cerca de 0,004 ng/μl. Estas porções apresentam pesagens muito distintas entre os protocolos (45 e 80 mg no protocolo N50 e 36 mg no protocolo N20) e, no entanto, apresentam a mesma quantidade de ADN recuperado, indicando que poderá ser todo o ADN recuperável. Estas porções apresentam alguma degradação e os IPC estão de acordo com o valor padrão, o que não afetaria muito a obtenção de alguns marcadores genéticos, no entanto as quantidades de ADN são reduzidas em relação à zona parietal.

Em análise à zona parietal do crânio, o protocolo N20 obteve para a amostra A.c5 a concentração de ADN de 0,0199 ng/μl, mais 192,7% da concentração obtida pelo protocolo N50 nas porções A.c1 e A.c2, 0,0057 ng/μl e 0,0079 ng/μl, respetivamente. Nestas porções, A.c1, A.c2 e A.c5, o ID apresenta-se muito elevado ou indeterminado pelo sistema. Esta indeterminação do valor do ID ocorre por os alvos LA não serem detetados, o que indica uma elevada degradação, tornando a fórmula do cálculo do ID sem valor exato. Esta degradação pode inviabilizar a obtenção de resultados na amplificação. Analisando as quantidades de pó de cada porção, no protocolo N50 as quantidades são diferentes entre elas, 33 mg e 64 mg, e as quantidades de ADN de cada também. Um resultado coerente, uma vez que o aumento da quantidade de pó aumenta a quantidade de ADN presente na amostra que se pode recuperar. Em relação ao protocolo N20, a massa de 41 mg encontra-se inserida nas pesagens do protocolo padrão, logo o aumento de ADN recuperado observado deve-se ao facto de amostra se encontrar mais concentrada.

A amostra A referente à zona parietal extraída com o protocolo N20 foi amplificada apenas para o *kit GlobalFiler™ PCR Amplification*, uma vez que esta amostra já estava analisada para o protocolo N50 e M50 e era necessário gerir a amostra disponível para que fosse suficiente para o protocolo N20 e M20. Para o protocolo M20 desta amostra foram realizadas duas extrações para a amplificação com os dois *kits*, visto ser uma amostra difícil e de rotina e ser necessário conseguir uma boa quantidade de ADN recuperado para uma amplificação mais eficiente.

Os perfis obtidos pelos protocolos normais da amostra A apresentam-se muito incompletos com vários *locus drop-out*, mesmo com a utilização de 4 μl de amostra em 40" de injeção. Resultados coerentes uma vez que os níveis de ADN disponível nesta amostra eram baixos (*inputs* inferiores a 0,29 ng) e o índice de degradação muito elevado (superior a 25,519) de onde resultam perfis parciais. A degradação pode afetar a amplificação de alguns marcadores genéticos devido à

falha na ligação dos *primers* em zonas afetadas, sendo que os primeiros a falhar são os *loci* de maior tamanho (Butler, 2012). Contudo, é visível um aumento de alelos recuperados com o protocolo N20, apresentando mais *loci* completos em relação ao protocolo N50. Nesta amostra para ambos os protocolos foi amplificado apenas um dos *kits* de amplificação o que diminui a informação genética disponível uma vez que cada *kit* tem para os mesmos marcadores genéticos, *primers* diferentes e logo zonas de ligação diferentes, o que em casos de amostras degradadas pode alterar o sucesso de amplificação.

Relativamente ao protocolo modificado, a amostra A, referente apenas à zona parietal, obteve um aumento de ADN recuperado com o protocolo teste (M20) de 5256% em relação ao protocolo M50. O aumento de ADN recuperado é muito elevado em relação ao protocolo padrão, e analisando as quantidades de pó utilizadas pode verificar-se que o protocolo M20 utilizou uma massa mais elevada de 189 mg para A.c8, mas não muito diferente da massa de 180 mg de amostra A.c9. A amostra concentrada obteve excelentes resultados contudo, os ID das porções permanecem muito elevados e indeterminados o que pode comprometer a obtenção de resultados. Os IPC mantiveram-se aceitáveis e inalterados, indicando que o aumento da quantidade de amostra não aumenta a presença de inibidores.

O aumento significativo na quantidade de ADN recuperado com o protocolo modificado teste, traduziu-se em perfis genéticos consideravelmente mais completos em comparação com o protocolo modificado padrão (Figura 8), no entanto ainda com necessidade de reaplicações na CE com 4µl de amostra em 40" de injeção. Apresentando alguns *locus drop-out* e *allele drop-out*, principalmente nos *loci* de maior tamanho, justificados pelo nível de degradação, o protocolo M20 obteve sucesso na amplificação de mais de metade dos marcadores genéticos analisados, um número superior ao número de marcadores genéticos obtidos pelo protocolo padrão, como se observa na Tabela 12. Para o protocolo modificado padrão, a utilização de apenas um *kit* de amplificação também diminui a informação genética disponível, no entanto, mesmo com a realização dos dois *kits* de amplificação, os resultados de quantificação permitiam prever um perfil mais completo para o protocolo teste.

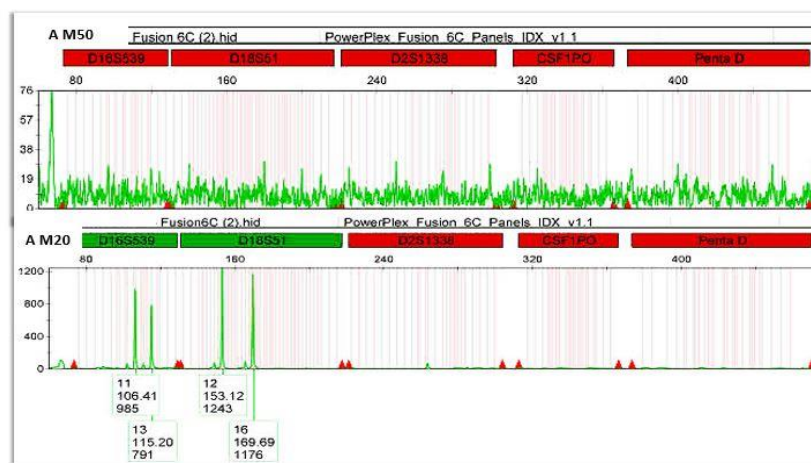


Figura 8 Perfis obtidos para a amostra A com os protocolos modificados M50 e M20

Na amostra B observa-se um aumento de 256,9% de ADN recuperado pelo protocolo N20 em relação ao protocolo padrão N50. Uma amostra com baixo nível de ADN recuperado com o volume de 50 µl de eluição que com o aumento da concentração do extrato consegue uma quantidade de ADN mais eficiente para a amplificação, 0,1749 ng/µl. Nesta amostra, as quantidades de pó de cada porção não são semelhantes, no entanto a quantidade de pó do protocolo teste enquadra-se nas quantidades do protocolo padrão, obtendo-se resultados coerentes uma vez que os níveis de ADN recuperado aumentam com o aumento da quantidade de pó.

O ID para a amostra B apresenta-se um pouco superior a 1 demonstrando alguma degradação, não se verificando uma alteração significativa entre os protocolos neste parâmetro. Analisando o valor de IPC, este manteve-se semelhante entre os protocolos. Os valores de ID e IPC praticamente inalterados indicam que estes não são afetados pelo aumento da concentração da amostra extraída com a utilização do protocolo teste.

A amostra B obteve perfis de marcadores genéticos relativamente semelhantes entre os protocolos e bastante completos, sendo que para o protocolo teste apresentou-se totalmente completo com 15'' de injeção, tempo padrão de análise (Figura 9). Resultados concordantes com o esperado tendo por base os dados da quantificação, que demonstram um baixo nível de degradação, que apenas levou à falha de um alelo no marcador genético Penta E, um marcador com maior tamanho em pares de base, sendo ainda um STR pentanucleótido, o que aumenta a possibilidade de falhas amplificação em amostras degradadas.

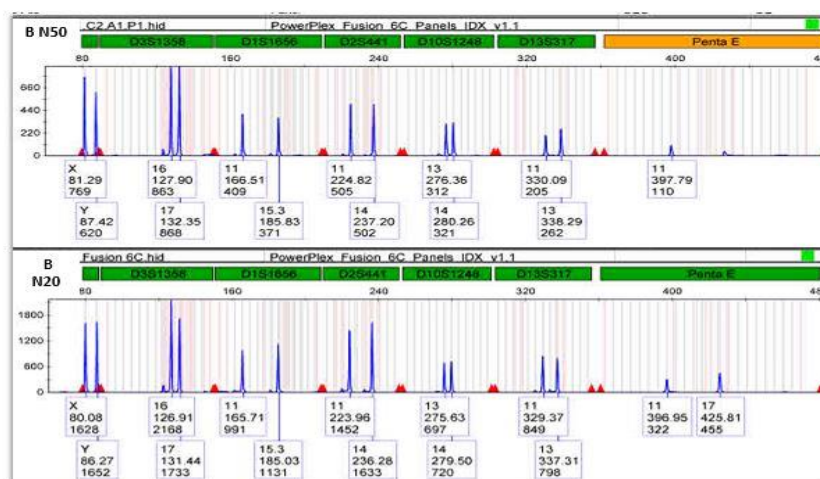


Figura 9 Perfis obtidos para a amostra B com os protocolos normais N50 e N20

A amostra C, tal como os fragmentos da amostra A da zona frontal, obteve quantidades de ADN recuperado com N20 semelhantes às obtidas com o volume padrão de 50 µl, com um aumento muito baixo de 7,7%. Analisando cada porção da amostra, pode-se verificar um aumento de ADN recuperado proporcional à quantidade de pó utilizada, independentemente do protocolo utilizado. A massa de 59 mg e a quantidade de ADN da C.c3 enquadra-se nas massas 54 e 62 mg e nas quantidades de ADN da C.c1 e C.c2. Deste modo, não se observa um aumento na quantidade de ADN recuperado com o protocolo N20 em relação ao padrão.

Nesta amostra, analisando os dados fornecidos pelo *HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2* na quantificação, demonstram que os valores de IPC das porções da amostra C (27,8721; 27,9336; 27,5885), estão de acordo com os 28 ciclos estipulados como referência, indicando que inibidores não interferiram com a PCR quantitativa. Em relação aos ID, verifica-se um aumento para 5,566 no protocolo teste, superior aos ID de 1,710 e 1,832 apresentados pelo protocolo padrão. Este aumento no ID na amostra eluída com 20 µl pode comprometer a obtenção do seu perfil genético, esperando-se maior perda de alelos em relação ao protocolo padrão.

Na amostra C, para o protocolo N20 não foi realizado o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* devido à necessidade de duas extrações com os 50 mg de pó de osso, que não foi possível devido à disponibilidade da amostra.

A amostra C apresenta um perfil completo para o protocolo padrão, com uma injeção de 40” para ambos os *kits* de amplificação. Um resultado que se previa tendo em conta a quantidade de ADN recuperado e os valores de ID não muito significativos. Relativamente ao protocolo teste, o sucesso na obtenção de resultados não superou o protocolo padrão (Figura 10), resultados esperados uma vez que para este protocolo existia uma maior degradação da amostra o que justifica as perdas de alelos para vários marcadores genéticos analisados, maioritariamente nos de maior tamanho.

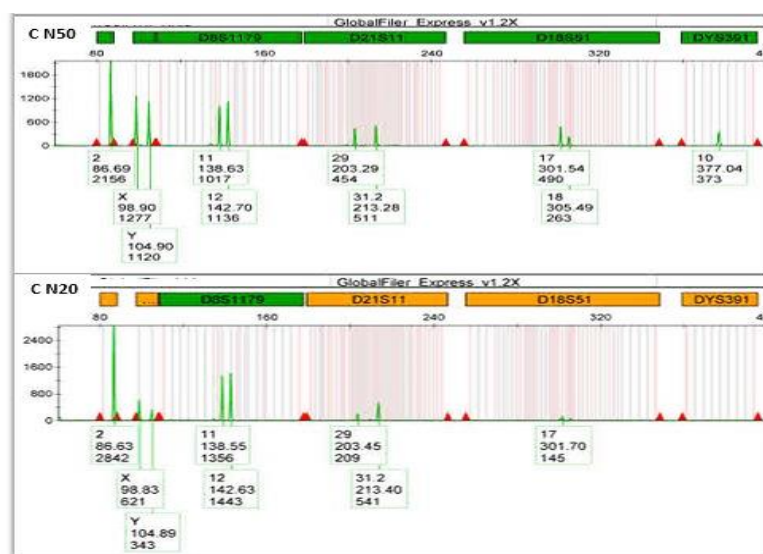


Figura 10 Perfis obtidos para a amostra C com os protocolos normais N50 e N20

Neste estudo, as amostras analisadas apresentaram grande variedade nos valores obtidos de ADN recuperado. As amostras D e E, para ambos os protocolos N20 e N50, apresentam uma elevada quantidade de ADN em relação às restantes amostras, o que pode indicar que o osso se encontrava em bom estado de preservação no momento da realização da perícia.

A amostra D com o protocolo teste recuperou 32,265 ng/μl de ADN, um aumento de 311,9% em relação ao protocolo padrão. No entanto, o aumento verifica-se também no valor de ID para o protocolo N20, embora continue um valor de degradação não muito elevado de 1,704. Nesta amostra o IPC também aumentou ligeiramente para 29,55 ciclos, apresentando-se superior aos 28 ciclos padrão. Tratando-se de uma amostra com elevada quantidade de ADN disponível, este aumento nos valores de IPC, justifica-se com a presença excesso de material que inibe a reação de PCR e pode resultar na presença de extra picos nos perfis de STRs.

A amostra E, com resultados semelhantes à amostra D, obteve um aumento de 266,8% com o protocolo N20, apresentando uma quantidade de 36,2181 ng/μl de ADN recuperado. Nesta amostra o aumento também é visível no ID e IPC, sendo que o aumento deste último foi mais significativo observando-se um IPC de 31,20 ciclos. Tal como na amostra D, a elevada quantidade de ADN presente interfere na reação de PCR.

Nas amostras D e E é perceptível o aumento de ADN recuperado com a utilização do protocolo teste, e neste caso, embora as quantidades de pó de amostra utilizadas não sejam muito similares, esperar-se-ia um aumento igualmente observável. Para estas mesmas amostras, como obtiveram excelentes resultados de quantificação, apenas uma porção de cada amostra foi amplificada de modo a gerir o material e tempo.

O elevado sucesso apresentado na quantificação, tal como esperado, é observado na obtenção dos perfis destas duas amostras. Com a necessidade de diluições para o processo de amplificação foi possível a utilização dos dois *kits* de amplificação e, os perfis consensos obtidos apresentam-se completos apenas com uma injeção de 15" na CE. Os perfis são semelhantes entre os protocolos, o esperado devido às quantidades de ADN disponíveis para ambos (Figura 11).

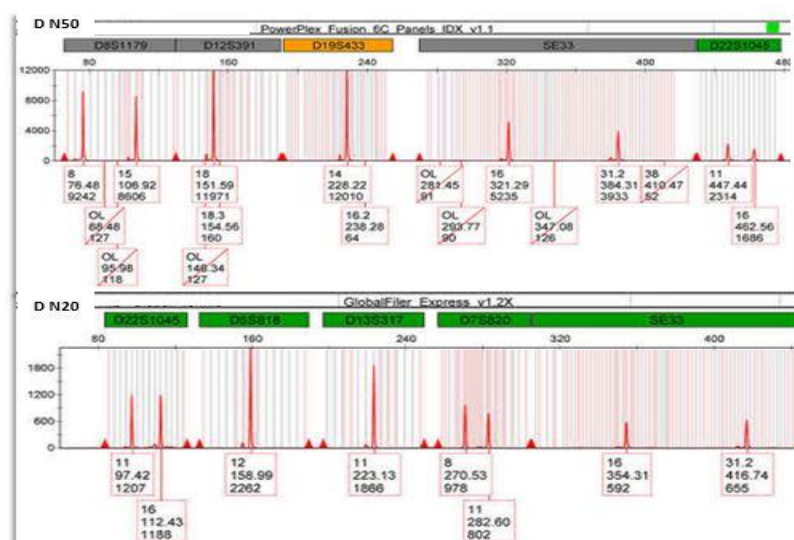


Figura 11 Perfis obtidos para a amostra D com os protocolos normais N50 e N20

Ao contrário das amostras D e E, a amostra F obteve das menores quantidades de ADN recuperado. Na F.c2 com o protocolo N50, foi quantificado 0,0008 ng/μl de ADN, o valor mais baixo neste estudo. Com o protocolo N20, a amostra F.c4 apresenta um aumento de 312,5% da concentração do protocolo padrão, no entanto possui menos quantidade de pó de amostra (56 mg) que a F.c2 (61 mg), e com massas semelhantes, poderia verificar-se um maior aumento de ADN recuperado. Os níveis de degradação sofreram um aumento muito significativo, de 2,1582 para 36,7578, o que comprometerá a obtenção de resultados na amplificação. Os IPC das porções desta amostra mantiveram-se aceitáveis e semelhantes entre os protocolos, não indicando a presença de possíveis inibidores.

A amostra F foi preparada com preferência no método modificado M20 devido aos baixos níveis de ADN obtidos com os protocolos normais e à pouca disponibilidade de pó de amostra, que impediu que se realizasse outra extração com 150 mg de pó, neste caso o M50. O protocolo escolhido foi o protocolo teste, visto que os valores obtidos anteriormente foram muito baixos e este demonstrou um aumento significativo de ADN com o protocolo normal, N20. Adicionalmente, sendo uma amostra da rotina, era importante obter o máximo de ADN desta amostra difícil para aumentar o sucesso do processo de análise. Contudo a quantidade de ADN com o M20 não aumentou significativamente comparativamente ao ADN recuperado com o protocolo N20.

As amostras F.c5 e F.c6 obtiveram 0,0037 ng/μl e 0,0044 ng/μl de ADN, respetivamente, pouco superior aos 0,0025 ng/μl de ADN recuperados com o N20. O M20 apresentou níveis de degradação muito inferiores (3,5443 e 1,9929) aos apresentados com o protocolo N20 (36,7578), demonstrando que o aumento do ID não se deve ao aumento da quantidade de ADN, uma vez que neste caso o volume de eluição foi o mesmo e o ID manteve-se em relação ao protocolo N50. Este aumento de ID pode ser devido à falha na deteção dos alvos LA durante o Real-Time PCR que levou ao aumento do valor de ID, visto que o pó é remetente da mesma amostra óssea apresentando a mesma qualidade. Devido aos valores de ID, os resultados do protocolo M20 deveriam apresentar maior sucesso em comparação aos resultados do protocolo N20.

Relativamente aos perfis obtidos, a amostra F, apenas amplificada para o protocolo teste, N20 e M20, apresentou baixo número de alelos recuperados, e sendo uma amostra com níveis de ADN recuperado muito baixos e logo *inputs* inferiores, era esperado que os perfis obtidos fossem incompletos. Com apenas uma extração para o protocolo N20, a amplificação para este utilizou apenas um dos *kits*, o *GlobalFiler™ PCR Amplification*. Adicionalmente, o protocolo N20 apresentou um ID elevado que também interfere no sucesso de amplificação, que com 4 μl de amostra em 40'' de injeção obteve vários *allele drop-out* e *locus drop-out*. Neste caso, com a realização do protocolo M20, que apresenta um ID mais baixo, os perfis obtidos demonstraram-se semelhantes.

Para a amostra G, com os níveis de ADN recuperado de 0,0022 ng/μl e 0,0032 ng/μl com o protocolo N50, observou-se um aumento de 211,11% com protocolo N20, para valores de 0,0191 ng/μl e 0,00731 ng/μl. Contudo as quantidades de pó utilizadas no protocolo N20 foram ligeiramente superiores às utilizadas pelo protocolo padrão. Os valores de ID desta amostra não se apresentaram muito elevados, sendo mais elevados para o protocolo teste. Os valores de IPC, neste caso, obtiveram mais ciclos para as porções do protocolo padrão, que pode indicar presença de inibidores, no entanto estes IPC estavam equivalentes ao valor de IPC do controlo negativo do processo de quantificação correspondente.

Para o protocolo teste N20, a amostra G apresentou um perfil bastante completo com 4μl de amostra em 40" de injeção, onde dois marcadores apresentaram *allele drop-out* e outros dois, marcadores genéticos pentanucleótidos, apresentaram *locus drop-out*. Resultados bastante positivos tendo em conta as quantidades reduzidas de ADN disponíveis, devido às quais a amostra extraída com o protocolo padrão não seguiu análise.

Relativamente ao protocolo modificado M20, a amostra G obteve um aumento de 126,2%. Uma diferença mais reduzida entre os protocolos em relação ao protocolo normal, mas com quantidades de pó de amostra utilizadas no protocolo M50 superiores às utilizadas no protocolo teste M20. Com quantidades de pó semelhantes o aumento de ADN recuperado poderia ter sido mais significativo. Os ID obtidos foram semelhantes entre protocolos e pouco superiores a 1, indicando um baixo ou moderado nível de degradação. Os valores de IPC mantiveram-se semelhantes e aceitáveis entre as várias porções, não indicando sinais de presença de inibidores.

Analisando os perfis obtidos, o protocolo M50 obteve perfis mais completos que o protocolo M20. Neste caso, a amostra obteve uma quantidade de ADN superior para o protocolo teste e, com valores de ID semelhantes entre os protocolos, era esperado que o protocolo M20 obtivesse melhores resultados. Não apresentando sinais de presença de inibidores na quantificação e com uma degradação não muito elevada, o que poderá justificar a obtenção de perfis mais incompletos serão erros no processo de amplificação que levaram à falha de alguns marcadores genéticos. Contudo, segundo o guia de utilização de *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit* a obtenção de ID entre 1 e 10, podem estar presentes inibidores de PCR, não sendo o suficiente para suprimir a amplificação do IPC, ou seja, não são detetados (ThermoFisher Scientific, 2017).

A amostra H apresentou um aumento de 179,9% na quantidade de ADN recuperado com o protocolo N20. Apresentando um baixo nível de ADN recuperado, as quantidades de pó utilizadas foram diferentes, mas os 56mg da H.c1 enquadram-se nos 51mg e 62mg da H.c3 e H.c4, sendo que o aumento observado entre a H.c1 e a H.c3 deveu-se apenas à concentração da amostra. Os valores de IPC mantiveram-se aceitáveis e os ID sem diferenças significativas entre os protocolos, o que permitia prever bons resultados de amplificação.

Apresentando um perfil bastante completo para o protocolo padrão com apenas 15" de injeção, a amostra H apresentou falhas nos marcadores Penta D e Penta E. Um perfil semelhante ao obtido pelo protocolo teste, que obteve um perfil completo com 40" de injeção. Resultados coerentes com os dados de quantificação, indicando uma semelhança na obtenção de perfis mesmo na presença de quantidades de ADN diferentes.

A amostra I com a utilização do protocolo teste N20, apresentou um aumento de 163,4% de ADN recuperado. Um aumento observável, no entanto, devido à quantidade de pó utilizada para o protocolo padrão ser superior às utilizadas pelo protocolo teste, a variação percentual pode ser maior que a calculada. Apresentou os ID superiores a 3, mantendo-se semelhante entre os protocolos. Valores de ID moderados que podem levar a perdas de alelos nos resultados de amplificação. Nesta amostra os valores de IPC também não foram afetados com o aumento da concentração do extrato.

Os perfis da amostra I apresentaram *allele drop-out* e *locus drop-out*, no entanto bastante completos com 40" de injeção. O protocolo N20 apresentou um perfil consenso mais completo, mas não muito diferente do obtido pelo protocolo N50. Os resultados obtidos foram coerentes com os dados de quantificação, apresentando falhas em alguns marcadores como se esperava devido aos valores de ID.

A amostra J, o dente, apresentou uma diferença mínima entre os protocolos, tanto nos níveis de ADN como nos níveis de degradação. Observou-se um pequeno aumento de 0,0095 ng/μl com o N50, para 0,0153 ng/μl e 0,0107 ng/μl com o N20 (+36,8%). Neste caso, os valores obtidos com o protocolo teste não foram muito significativos tendo em conta o esperado, mas o facto de as quantidades de pó de amostra do protocolo N50 serem superiores às quantidades do protocolo N20, pode ser a justificação para não ter ocorrido um aumento mais significativo. Os valores de IPC não foram afetados com o aumento da concentração do extrato, e os ID obtidos foram muito próximos de 1, não se esperando falhas significativas na obtenção de resultados.

Relativamente à obtenção dos perfis da amostra J, ambos os protocolos obtiveram perfis bastante completos com 40" de injeção (Figura 12), com ocorrência de *allele drop-out* e *locus drop-out*, justificados com os baixos níveis de ADN disponíveis e a presença de alguma degradação. Usualmente, os dentes apresentam uma maior taxa de recuperação de alelos em relação aos ossos (Milos *et al.*, 2007), sendo uma amostra também preferível em casos de DVI, no entanto este dente apresentou níveis de ADN baixos comparativamente aos ossos, o que pode indicar um mau estado de conservação.

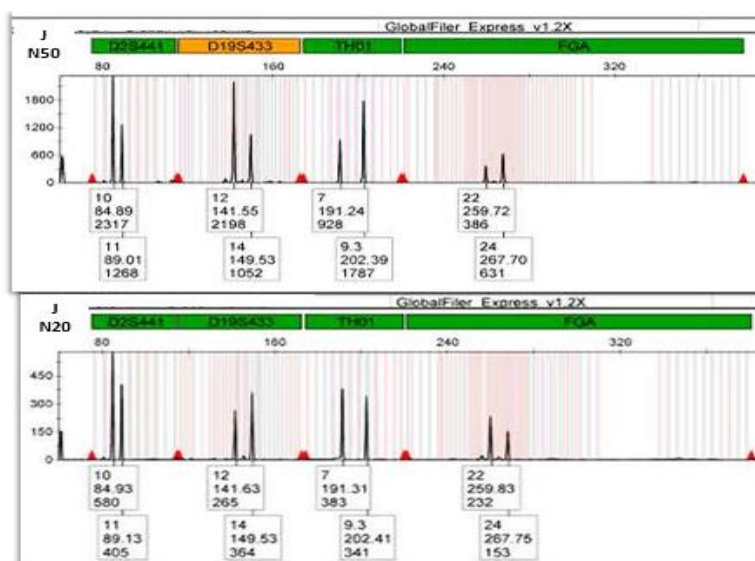


Figura 12 Perfis obtidos para a amostra J com os protocolos normais N50 e N20

A amostra K também aumentou os níveis de ADN recuperado com o protocolo teste (+277%). As amostras extraídas com o M50, a K.c1, K.c2 e K.c3, obtiveram 0,0971 ng/μl, 0,1739 ng/μl e 0,272 ng/μl de ADN, respetivamente. Com o M20 os valores de ADN recuperado aumentaram para 0,7113 ng/μl e 0,6532 ng/μl. Nesta amostra o ID sofreu uma pequena diminuição com o M20, embora ainda com valores altos, 6,5739 e 5,8463, que se podem traduzir em falhas na amplificação de alguns marcadores genéticos. Os valores de IPC mantiveram-se aceitáveis, o que mais uma vez demonstra que este parâmetro não foi afetado com o aumento da concentração do extrato.

A amostra K obteve perfis consenso relativamente semelhantes entre os protocolos e bastante completos. Com níveis de ADN disponível razoáveis para ambos os protocolos, esta amostra apresentou resultados coerentes, sendo que o elevado ID não interferiu significativamente com o sucesso da amplificação, onde apenas três dos *loci* apresentaram *allele drop-out* e *locus drop-out* para ambos os protocolos. Para o M20, o tempo de injeção foi aumentado para o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* uma vez que apresentava mais perda de alelos para este, contudo para o M20 o *kit GlobalFiler™ PCR Amplification* apresentou-se completo.

O protocolo teste de volume de eluição de 20 μl demonstra um maior sucesso na recuperação de ADN das amostras ósseas em relação ao protocolo padrão com um extrato de 50 μl. Sempre com um aumento nos níveis de ADN, os resultados demonstram que o protocolo teste não afeta significativamente o ID da amostra e o IPC, indicando que o aumento da quantidade de ADN presente no extrato não altera a presença de possíveis inibidores na amostra. Em relação aos resultados de amplificação, obteve-se maior sucesso na obtenção de perfis consenso nas amostras tratadas com o N20 uma vez que as quantidades de ADN disponível, no geral, eram superiores.

Contudo, o sucesso de obtenção de perfil foi semelhante entre os protocolos, sendo relevante realçar que os *kits* de amplificação utilizados são adequados a amostras de baixo nível de ADN e com presença de degradação.

Conclusão

A avaliação dos níveis de ADN recuperado demonstrou que o protocolo teste, com 20 µl de volume de eluição obteve resultados de acordo com o esperado, concordantes com o pressuposto de que se obteria maiores concentrações de ADN ao diminuir o volume de eluição. Um dos pontos deste trabalho seria observar se a concentração das amostras alteraria os ID e/ou a presença de potenciais inibidores, sendo que não foram observadas inibições no processo de quantificação das amostras, existindo, contudo, algumas alterações nos ID que não se podem associar exclusivamente ao aumento da concentração do extrato, uma vez que não se observa em toda a amostragem. Este método mostrou-se muito útil para amostras difíceis com baixos níveis de ADN e/ou elevada degradação, uma vez que no geral, conseguiu aumentar a concentração de ADN recuperado e assim obter perfis com maior qualidade que com o protocolo em uso, aumentando a eficiência de análise o que é importante em casos de DVI, em que o tempo é um ponto crucial.

Como ponto negativo, este protocolo com 20 µl de volume de eluição possui um aumento do número de extrações por amostra, uma vez que o diminuto volume de eluição final obtido não é suficiente para todos os processos de análise (a quantificação e a amplificação com dois *kits*) quando as concentrações de ADN disponível são reduzidas. O facto de se necessitar de mais quantidade de pó de osso para as extrações pode ser uma barreira a este protocolo quando a amostra disponível é muito limitada.

Concordante com a revisão da bibliografia, neste estudo observa-se o sucesso da extração de amostras difíceis com a utilização do kit *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction* no *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System*, não se verificando nenhuma contaminação. A extração de fase sólida de ADN por partículas magnéticas obteve uma elevada eficiência em amostras ósseas difíceis e com escassez de ADN, sendo que as impurezas foram eliminadas na extração.

O papel do fémur como amostra preferencial em casos em que existem apenas restos cadavéricos disponíveis é realçado, visto que dentro de toda amostragem, em relação ao crânio, estes obtiveram perfis genéticos mais completos. Contudo, o reduzido número de amostras testadas provenientes de ossos que não fémures não permite retirar conclusões definitivas.

Embora não fosse o âmbito deste trabalho, a análise mais pormenorizada das amostras vestígio, como as suas idades *ante* e *post-mortem* e os meios externos a que foram expostas, seria interessante para analisar com mais detalhe os dados obtidos de níveis de ADN recuperados e de degradação, uma vez que a amostragem é bastante variável, de modo a também melhorar os critérios de seleção de amostras vestígios em contexto de DVI.

Futuramente, dever-se-ia proceder à avaliação deste protocolo teste noutras amostras vestígio, como amostras de raspados subungueais e de células epiteliais, que são amostras que normalmente apresentam baixos níveis de ADN e, em muitos casos forenses, é a única forma de identificação do perpetrador.

Referências Bibliográficas

- Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition - A review. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 297–305. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.006>
- Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., Fernández de Simon, L., Jesús Iturralde, M., ... Sancho, M. (2005). Challenges of DNA profiling in mass disaster investigations. *Croatian Medical Journal*, 46(4), 540–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16100756>
- Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., Primorac, D., García, O., ... Fernández-Piqueras, J. (2003). Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croat Med J*, 44(3), 273–280. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808718>
- Bregu, J., Conklin, D., Coronado, E., Terrill, M., Cotton, R. W., & Grgicak, C. M. (2013). Analytical Thresholds and Sensitivity: Establishing RFU Thresholds for Forensic DNA Analysis,. *Journal of Forensic Sciences*, 58(1), 120–129. <http://doi.org/10.1111/1556-4029.12008>
- Brevnov, M., Mundt, J., Benfield, J., Treat-Clemons, L., Kalusche, G., Meredith, J., ... Shewale, J. G. (2009). Automated Extraction of DNA from Forensic Sample Types Using the PrepFiler Automated Forensic DNA Extraction Kit. *Journal of Laboratory Automation*, 14(5), 294–302. <http://doi.org/10.1016/j.jala.2009.06.006>
- Budowle, B., & van Daal, A. (2009). Extracting evidence from forensic DNA analyses: future molecular biology directions. *BioTechniques*, 46(5), 339–350. <http://doi.org/10.2144/000113136>
- Buś, M. M., Bogdanowicz, W., & Vödrös, D. (2013). DNA Analysis of Ancient Bone and Tooth Samples by Using PrepFiler® Express BTA Forensic DNA Extraction and AmpFSTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kits. Retrieved July 27, 2018, from https://www.researchgate.net/publication/235994743_DNA_Analysis_of_Ancient_Bone_and_Tooth_Samples_by_Using_PrepFilerR_Express_BTA_Forensic_DNA_Extraction_and_AmpFISTRR_NGM_SElect_PCR_Amplification_Kits
- Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Sciences*, 51(2), 253–265. <http://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x>
- Butler, J. M. (2007). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques*, 43(4). <http://doi.org/10.2144/000112582>
- Butler, J. M. (2009). *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (1st ed.). Maryland, USA: Elsevier.
- Butler, J. M. (2012). *Advance Topics in Forensic DNA Typing* (1st ed.). Maryland, USA: Elsevier.
- Butler, J. M., Coble, M. D., & Vallone, P. M. (2007). STRs vs. SNPs: Thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 3(3), 200–205. <http://doi.org/10.1007/s12024-007-0018-1>
- Campos, P. F., Craig, O. E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., & Gilbert, M. T. P. (2012). DNA in ancient bone - Where is it located and how should we extract it? *Annals of Anatomy*, 194(1), 7–16. <http://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.07.003>
- Caputo, M., Irisarri, M., Alechine, E., & Corach, D. (2013). A DNA extraction method of small quantities of bone for high-quality genotyping. *Forensic Science International: Genetics*, 7(5), 488–493. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.05.002>
- Chang, H. N. (2018). Advanced Short Tandem Repeat Genotyping for Forensic, 509–529.

- Cisana, S., Cerri, N., Bosetti, A., Verzeletti, A., & Cortellini, V. (2017). PowerPlex® Fusion 6C System: evaluation study for analysis of casework and database samples. *Croatian Medical Journal*, 58(1), 26–33. <http://doi.org/10.3325/cmj.2017.58.26>
- Corte-Real, A., & Porto, M. J. (2015). Identificação genética. http://doi.org/DOL:http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0963-8_8
- D.A.Wells. (2000). *Solid-Phase Extraction With Cartridges. Sample Preparation Solutions* (Vol. III). Academic Press. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.04918-0>
- Dahm, R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, 278(2), 274–288. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>
- Davoren, J., Vanek, D., Konjhodžić, R., Crews, J., Huffine, E., & Parsons, T. J. (2007). Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croatian Medical Journal*, 48(4), 478–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696302>
- Decorte, R. (2010). Genetic identification in the 21st century — Current status and future developments. *Forensic Science International*, 201(1–3), 160–164. <http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.02.029>
- Desmyter, S., De Cock, G., Moulin, S., & Noël, F. (2017). Organic extraction of bone lysates improves DNA purification with silica beads. *Forensic Science International*, 273, 96–101. <http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.02.003>
- Filippini, G. (2010). *Human Skeletal Remains: Development of DNA Extraction and Typing Methods*. University of Verona. Retrieved from <http://hdl.handle.net/11562/343853>
- Gouveia, N. B. M. (2015). *Validação e implementação do kit Quantifiler □ Trio DNA Quantification em amostras forenses*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10451/22594>
- Graham, E. A. M. (2006). Disaster Victim Identification. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 2(3), 203–207. <http://doi.org/10.1385/Forensic>
- Hartman, D., Drummer, O., Eckhoff, C., Scheffer, J. W., & Stringer, P. (2011). The contribution of DNA to the disaster victim identification (DVI) effort. *Forensic Science International*, 205(1–3), 52–58. <http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.09.024>
- Higgins, D., & Austin, J. J. (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Science and Justice*, 53(4), 433–441. <http://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.06.001>
- Holland, M. M., Cave, C. a, Holland, C. a, & Bille, T. W. (2003). Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. *Croatian Medical Journal*, 44(3), 264–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808717>
- Holmes, A. S., Houston, R., Elwick, K., Gangitano, D., & Hughes-Stamm, S. (2018). Comparison of four commercial qPCR kits for analyzing inhibited and degraded forensic samples. Retrieved June 22, 2018, from <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=873477a8-a5a4-45b6-87e7-9a6e13fa844e&lang=en>
- Iwamura, E. S. M., Soares-Vieira, J. A., & Muñoz, D. R. (2004). Human identification and analysis of DNA in bones. *Revista Do Hospital Das Clínicas*, 59(6), 383–388. <http://doi.org/10.1590/S0041-87812004000600012>
- Iyavoo, S., Hadi, S., & Goodwin, W. (2013). Evaluation of five DNA extraction systems for recovery of DNA from bone. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e174–e175. <http://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.090>

- Kim, Y. T., Heo, H. Y., & Seo, T. S. (2018). Advanced Short Tandem Repeat Genotyping for Forensic. In H. N. Chang (Ed.), *Emerging Areas in Bioengineering* (First Edit, pp. 509–529). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Lareu, M. (2013). Short Tandem Repeats. In *Wiley Encyclopedia of Forensic Science* (2nd ed., pp. 219–226). Santiago de Compostela: Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00040-4>
- Lin, S., Li, C., & Ip, S. C. Y. (2017). A selection guide for the new generation 6-dye DNA profiling systems. *Forensic Science International: Genetics*, 30, 34–42. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.05.010>
- Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., & Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics*, 1, 191–195. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.006>
- Ludeman, M. J., Zhong, C., Mulero, J. J., Lagacé, R. E., Hennessy, L. K., Short, M. L., & Wang, D. Y. (2018). Developmental validation of the GlobalFiler® PCR amplification Kit: A 6-dye multiplex assay designed for amplification of casework samples. *International Journal of Legal Medicine*, 19, 148–155. <http://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00414-018-1817-5>
- McLamb, J. M. (2017). *Application of Enhancement Strategies for the Improvement of Discriminating Forensic Dna Profiles From Human Bones*. Western Carolina University. Retrieved from <https://libres.uncg.edu/ir/wcu/f/McLamb2017.pdf>
- Milos, A., Selmanović, A., Smajlović, L., Huel, R. L. M., Katzmarzyk, C., Rizvić, A., & Parsons, T. J. (2007). Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croatian Medical Journal*, 48(4), 486–493. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696303>
- Montelius, K., & Lindblom, B. (2012). DNA analysis in disaster victim identification. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 8(2), 140–147. <http://doi.org/10.1007/s12024-011-9276-z>
- Nacham, O., Clark, K. D., & Anderson, J. L. (2016). Extraction and Purification of DNA from Complex Biological Sample Matrices Using Solid-Phase Microextraction Coupled with Real-Time PCR. *Analytical Chemistry*, 88(15), 7813–7820. <http://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01861>
- Nalla, R. K., Kruzic, J. J., Kinney, J. H., Balooch, M., Ager, J. W., & Ritchie, R. O. (2006). Role of microstructure in the aging-related deterioration of the toughness of human cortical bone. *Materials Science and Engineering: C*, 26(8), 1251–1260. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2005.08.021>
- Nicklas, J. A., & Buel, E. (2003). Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(8), 1160–7. <http://doi.org/10.1007/s00216-003-1924-z>
- Oorschot, R. A. van, Ballantyne, K. N., & Mitchell, R. J. (2010). Forensic trace DNA: A review. *Investigative Genetics*, 1(1), 14. <http://doi.org/10.1186/2041-2223-1-14>
- Paes, R., & Ribeiro, I. (2016). Importance of Forensic DNA for Modern Biology: a Review. *Ensaios Cienc., Cienc. Biol. Agrar. Saúde*, 20(1), 30–37. Retrieved from <http://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=26045778005>
- Pajnič, I. Z. (2017). Evaluation of the quality of bone powder for successful STR typing of human skeletal remains. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 25(1), 92–98. <http://doi.org/10.4323/rjlm.2017.92>
- Pajnič, I. Z., Debska, M., Pogorelc, B. G., Mohorčič, K. V., Balažic, J., Zupanc, T., ... Geršak, K. (2016). Highly efficient automated extraction of DNA from old and contemporary skeletal remains. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 37, 78–86. <http://doi.org/10.1016/j.jflm.2015.11.001>

- Plotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2016). Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 77, 23–43. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.010>
- Prinz, M., Carracedo, A., Mayr, W. R., Morling, N., Parsons, T. J., Sajantila, A., ... Schneider, P. M. (2007). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International: Genetics*, 1(1), 3–12. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2006.10.003>
- Promega Corporation. (2017). PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Genetic Analyzers PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers. Retrieved March 28, 2018, from <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-fusion-6c-system-protocol.pdf>
- Reedy, C. R., Bienvenue, J. M., Coletta, L., Strachan, B. C., Bhat, N., Greenspoon, S., & Landers, J. P. (2010). Volume reduction solid phase extraction of DNA from dilute, large-volume biological samples. *Forensic Science International: Genetics*, 4(3), 206–212. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.09.005>
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient dna extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756–1762. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- Siriboonpiputtana, T., Rinthachai, T., Shotivaranon, J., Peonim, V., & Rerkamnuaychoke, B. (2018). Forensic genetic analysis of bone remain samples. *Forensic Science International*, 284, 167–175. <http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.12.045>
- Stagg, K. (2010). *DNA Degradation in Teeth and Bones*. Uppsala University. Retrieved from http://www.ibg.uu.se/digitalAssets/101/a_101663-f_stagg-kelda-bsc-thesis.pdf
- Tan, S. C., & Yip, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1–10. <http://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Terra Pinheiro, M. de F. (2009). *CSI Catástrofes*. (Edições Univ. Fernando Pessoa, Ed.). Porto.
- Terra Pinheiro, M. de F. (2010). *Genética Forense Perspectivas da Identificação Genética*. (Edições Univ. Fernando Pessoa, Ed.). Porto.
- ThermoFisher Scientific. (2012). PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits User Guide. Retrieved December 18, 2018, from https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4441982_AutoMateExp_UG.pdf
- ThermoFisher Scientific. (2016). GlobalFiler® PCR Amplification Kit User Guide. Retrieved January 23, 2018, from <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4477604.pdf>
- ThermoFisher Scientific. (2017). Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits. Retrieved January 20, 2018, from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf>
- ThermoFisher Scientific. (2018). AutoMate Express™ Instrument User Guide. Retrieved May 26, 2018, from https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4441982_AutoMateExp_UG.pdf
- Topçu, A. A., Aşır, S., & Türkmen, D. (2016). DNA Purification by Solid Phase Extraction (SPE) Methods. *Hacettepe J. Biol. & Chem. Hacettepe J. Biol. & Chem*, 44(443), 259–266. <http://doi.org/10.15671/HJBC.20164420568>
- Vanek, D., Saskova, L., Votrubova, J., & Emmerova, B. (2015). Factors influencing the reliability of DNA typing results for bone samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e667–e668. <http://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.248>

- Vernarecci, S., Ottaviani, E., Agostino, A., Mei, E., Calandro, L., & Montagna, P. (2015). Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: A matter of degradation. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 77–85. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.12.005>
- Walker, J. M. (2016). *Forensic DNA Typing Protocols*. (W. Goodwin, Ed.) (2nd ed., Vol. 1420). New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0>
- Westen, A. A., Gerretsen, R. R. R., & Maat, G. J. R. (2008). Femur, rib, and tooth sample collection for DNA analysis in disaster victim identification (DVI). *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 4(1), 15–21. <http://doi.org/10.1007/s12024-007-0027-0>
- White, T. D., Black, M. T., & Folkens, P. A. (2012). Bone Biology and Variation. In *Human Osteology* (3rd ed., pp. 25–42). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374134-9.50003-9>
- Witt, S., Neumann, J., Zierdt, H., Gébel, G., & Röscheisen, C. (2012). Establishing a novel automated magnetic bead-based method for the extraction of DNA from a variety of forensic samples. *Forensic Science International: Genetics*, 6(5), 539–547. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.01.002>
- Ziętkiewicz, E., Witt, M., Dąca, P., Żebracka-Gala, J., Goniewicz, M., Jarząb, B., & Witt, M. (2012). Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *Journal of Applied Genetics*, 53(1), 41–60. <http://doi.org/10.1007/s13353-011-0068-7>